

Vol. 26, No. 2.

September, 1937.

# THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

**SAMURO KAKIUCHI**

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,

11 Itchome Kagacho, Ushigome.

Price: \$ 5.50 per volume.





## STUDIEN ÜBER DEN INTERMEDIÄREN STOFF- WECHSEL DES TRYPTOPHANS.

### XXVI. Biochemisches über das *d*-Kynurenin.

VON

Y. KOTAKE (jr.) UND N. ITÖ.

(Aus dem Biochem. Institut d. Medizin. Fakultät d. Kaiserl. Universität  
zu Ōsaka.)

(Eingegangen am 16. März 1937).

In der XXV. Mitteilung veröffentlichten wir, dass das Kaninchen bei der Fütterung mit *d*-Tryptophan *d*-Kynurenin ausscheidet, während dies bei der subcutanen Injektion desselben nicht der Fall war. Es lässt sich also annehmen, dass *d*-Tryptophan entweder durch gewisse Bakterien, die im Darm des Kaninchens gedeihen, oder in der Darmwand bei seiner Resorption in *d*-Kynurenin umgewandelt wird.

Zunächst haben wir aus dem Dünndarminhalt des Kaninchens durch Züchtung *Subtilis*, *Proteus* und *Coli* isoliert und damit die Spaltungsversuche ausgeführt, unter welchen beim einen *dl*-Tryptophan, beim anderen *d*-Tryptophan verwendet wurde. Da jedoch hierbei kein Kynurenin gebildet, sondern nur *dl*-Tryptophan asymmetrisch gespalten wurde, haben wir es dann unternommen, denselben Versuch durch Gebrauch des Darmwandextraktes auszuführen. Der letztere wurde nach der Vorschrift von Prof. Y. Kotake und Masayama vorgenommen und die hierbei gebildeten Kynureninkörper wurden quantitativ bestimmt. Diese Versuche haben stets deutliche und eindeutige Resultate gegeben. Klarheitshalber möchten wir jedoch über dieselben später zusammen mit der Isolierung des Kynurenins als Substanz berichten.

Dass die Kynurensäurebildung im tierischen Organismus asymmetrisch vor sich geht, sodass nur *l*-Tryptophan in die genannte Säure übergeht, wurde schon vor langer Zeit durch die Arbeit von Matsuoka, Takemura und Yoshimatsu in unserem

Laboratorium wahrscheinlich gemacht. Sie fanden nämlich beim Kaninchen beim Gebrauch des *dl*-Tryptophans eine viel geringere Menge Kynurensäureausscheidung im Vergleich zu dem des *l*-Tryptophans. Diese asymmetrische Kynurensäurebildung wurde neuerdings von Berg durch Verwendung des *d*-Tryptophans weiter bestätigt.

In der XXV. Mitteilung haben wir den Gedanken ausgesprochen, dass die Kynurensäurebildung im tierischen Organismus ausser der Kynureninbildung aus Tryptophan noch einen asymmetrischen Verlauf durchmacht, was darin besteht, dass *d*-Kynurenin nicht mehr im Organismus in Kynurensäure übergeht. Da wir in letzter Zeit über reichliche Mengen von *d*-Kynurenin verfügten, haben wir versucht, ob es beim Kaninchen wirklich keine Kynurensäurebildung verursacht.

Es ist uns bekannt, dass die Kynurensäurebildung aus Tryptophan nicht nur im tierischen Organismus, sondern auch durch gewisse Mikroorganismen z. B. *Oidium* vor sich geht. Da es uns wahrscheinlich schien, dass *Oidium* ausschliesslich *l*-Kynurenin dabei angreift, haben wir es nun unternommen auf Grund desselben Vorgangs *dl*-Kynurenin asymmetrisch zu spalten, um daraus *d*-Kynurenin gewinnen zu können.

#### EXPERIMENTELLES.

##### 1. *Tryptophanversuche mit Darmbakterien.*

Aus dem Dünndarminhalt des Kaninchens, welches imstande war, bei der Einführung des *d*-Tryptophans *d*-Kynurenin auszuschcheiden, wurde durch Züchtung auf Agarnährboden je ein Stamm *Subtilis*, *Proteus* und *Coli* rein isoliert. Da es jedoch schwer war, *Subtilis* und *Proteus* voneinander zu trennen, haben wir es beim einen mit einem Gemisch von *Subtilis* und *Proteus* und beim anderen mit *Coli* versucht, und zwar wurde die hierbei gebrauchte Nährlösung wie folgt bereitet:

Kaliumchlorid	1.0 g
Ammoniumchlorid	1.0 „
Magnesiumsulfat	0.1 „
Glycerin	25.0 „



Aluminiumphosphat	0.5 „
Henderson's Phosphatmischung	170.0 ccm
+ Destilliertes Wasser 1000.0 ccm	

Hierin wurde 1.0 g *d*-Tryptophan gelöst und 40 Tage nach der Sterilisation und Impfung mit dem obengenannten Bakterien-gemisch im Brutofen aufbewahrt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Flüssigkeit von den Bakterienleibern getrennt und auf die übliche Weise behandelt in der Absicht, daraus das unverändert zurückgebliebene Tryptophan, Kynurenin und Kynurensäure zu isolieren. Es gelang uns jedoch nur 0.5 g unveränderten Tryptophans völlig rein zu gewinnen, wie aus der folgenden spezifischen Drehung ersichtlich ist.

$$[\alpha]_D^{22} = \frac{+0.20 \times 100}{2 \times 0.313} = +31.95^\circ$$

Bei einem anderen Versuch wurde die Nährlösung mit 1,0 g *dl*-Tryptophan versetzt und ebenfalls nach der Sterilisation und Impfung mit dem Bakteriengemisch 40 Tage im Brutofen stehen-gelassen. Diesmal wurde 0.15 g Tryptophan als ein völlig reine Substanz isoliert. Es lässt sich aus der folgenden spezifischen Drehung erkennen, dass das Präparat ein Gemisch von *d*- und *dl*-Tryptophan ist.

$$[\alpha]_D^{20.5} = \frac{+0.17 \times 100}{2 \times 0.394} = +21.6^\circ$$

Ferner haben wir bei diesem Versuch eine geringe Menge Substanz bekommen, die nach ihren Eigenschaften insbesondere durch eine Fluoreszenz der ätherischen Lösung wahrscheinlich Anthranil-säure war, welche zunächst von Sasaki und später von Kotake und Ōtani bei der Spaltung des Tryptophans mittels desselben Bakteriums gewonnen war. Kynurensäure wurde nicht gefunden.

Der Spaltungsversuch des *d*-Tryptophans mittels des isolierten Colis erfolgte in der Zipfelschen Lösung. Hierbei wurde ebenfalls weder Kynurenin noch Kynurensäure gebildet, indem *d*-Tryptophan unverändert zurückblieb.

## 2. Spaltungsversuch des *dl*-Kynurenins mittels *Oidium lactis*.

Beim *Oidium*versuch wurde eine Stamm *Oidium* verwendet,

der bisher von uns benutzt worden war und eine Kynurensäurebildung aus *l*-Kynurenin bestätigt. Das hier verwendete *dl*-Kynurenin war dasjenige, das durch die wiederholt ausgeführten Fütterungsversuche mit *dl*-Tryptophan gewonnen war (siehe XXV Mitt.).

Als Nährlösung diente die folgende:

Rohrzucker	10.0 g
Kaliummonophosphat	0.5 „
Kaliumdiphosphat	0.5 „
Magnesiumsulfat	0.1 „
Natriumchlorid und Eisenchlorid	Spur
+ Leitungswasser 1000.0 ccm	

Die Nährlösung wurde mit 3 g *dl*-Kynurenin versetzt. Sie wurde nach der Dampfsterilisation und der Impfung mit dem *Oidium* 3 Wochen lang bei 25°C stengelassen. Die durch ein Glasfilter vom Pilz befreite Flüssigkeit wurde nach unserem Verfahren behandelt und schliesslich ausser 0,076 g Kynurensäure 0,9 g Kynurenin wieder gewonnen. Letzteres erwies sich nach der Bestimmung der spezifischen Drehung als ein völlig reines *d*-Kynureninpräparat.

Als Sulfat:

$$[\alpha]_D^{18.5} = \frac{-0.29 \times 100}{2 \times 1.368} = -10.6^\circ$$

als freie Substanz:

$$[\alpha]_D^{18} = \frac{+0.24 \times 100}{2 \times 0.416} = +28.8^\circ$$

### 3. Schicksal des *d*-Kynurenins im Kaninchenorganismus.

Das *d*-Kynurenin aus den Kaninchenversuchen (Siehe XXV Mitt.), wurde wieder dem Kaninchen unter die Haut eingespritzt, und der innerhalb von 24 Stunden gelassene Harn auf Kynurensäure untersucht. Als Kontrolle wurden die Versuche mit *l*-Tryptophan und mit *l*-Kynurenin durchgeführt. Einfachheit halber haben wir die ganzen Resultate in einer Tabelle zusammengestellt.



Gegebene Substanz g	Kynurensäure (roh) g
Nichts gegeben	Spur?
<i>l</i> -Tryptophan 0,5	0,1956
<i>l</i> -Kynurenin 0,35	0,1886
(Sulfat: $[\alpha]_D = +10,3^\circ$ )	
<i>d</i> -Kynurenin 0,4	
(Sulfat: $[\alpha]_D = -9,5^\circ$ )	Spur?

Nach den Untersuchungen, welche bisher in unserem Laboratorium vorgenommen wurden, gibt der Harn des Kaninchens, dem *l*-Kynurenin gegeben wurde, stets die Ehrlichsche Diazoreaktion. So haben wir auch mit dem *d*-Kynureninharn die genannte Reaktion probiert. Sie fiel jedoch völlig negativ aus.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. *Coli*, *Subtilis* und *Proteus*, welche aus dem Dünndarminhalt des Kaninchens isoliert wurden, sind nicht imstande, *d*-Tryptophan zu spalten. Hierbei wurden weder Kynurenin noch Kynurensäure gebildet.

2. *Oidium lactis* spaltet *dl*-Kynurenin asymmetrisch, wobei *d*-Kynurenin mit einer kleinen Menge Kynurensäure unverändert zurückbleibt.

3. *d*-Kynurenin ist im Kaninchenorganismus kein Kynurensäurebildner. Ebenso wenig scheidet das Kaninchen hierbei im Harn Ehrlichsche diazopositive Substanzen aus.

#### LITERATUR.

- Berg (1934): *Jl. of Biolog. Chem.*, **104**, 373.  
 Hamada, T.: Noch nicht publiziert.  
 Kotake, Y. (jr.) u. Ito, N. (1937): *Jl. of Biochem.*, **25**, 71.  
 Kotake, Y. u. Masayama, T.: Noch nicht publiziert.  
 Kotake, Y. u. S. Otani (1933): *Hopper-Seyler's Zeitschr. f. physiolog. Chem.*, **214**, 1.  
 Kotake, Y. u. S. Otani (1930): *Med. Ges. zu Osaka.*, **29**, 283.  
 Matsuoka, Z., Takemura, S. u. Yoshimatsu, N. (1925): *Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiolog. Chem.*, **143**, 199.  
 Sasaki, T. (1923): *Jl. of Biochem.*, **2**, 251.  
 Shichiri, G. u. Kiyokawa, M. (1931): *Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiolog. Chem.*, **195**, 166.



Digitized by the Internet Archive  
in 2024



## STUDIES ON THE CHANGES IN THE PHYSIOLOGICAL CONDITION OF THE NEW BORN INFANT. V.

### On the Synthesis of Indican.

By

TADASHI SHŌJI.

*(From the Departments of Gynaecology and Medical Chemistry, affiliated  
College of Medicine, Taihoku Imperial University.)*

(Received for publication, March 31, 1937)

#### I. INTRODUCTION.

It is generally believed that the indican in urine is synthesised as the result of the body's efforts to detoxicate the indol that is produced by the breakdown of tryptophane. The site of its synthesis has been considered to be in the liver by Jaffe (1877), Baumann (1879), Gautice and Hervieux (1907), and in the lungs by Sawada (1925), Katoh (1934), while the view that the reticuloendothelial system is also associated with the synthesis of these sulphuric ethers has been put forward by Nakatani (1927), and denied by Hasegawa (1927), Ikeyama (1931) and Kimura (1934).

In Report IV of this series, liver functional tests on young dogs were made with three different dyes, substances foreign to the body. Here experiments were continued to examine the power of these animals to detoxicate the *indol* that is produced as a result of protein catabolism. This was considered extremely necessary not only from an experimental point of view, but also from clinical considerations. The results showed that in the processes of synthesis and excretion, the excretion of indican in animals one to two weeks after birth was delayed while the quantity synthesised was extremely poor in those one to five days old.

## II. EXPERIMENTAL.

1. *Materials and method.*

As in previous experiments, young dogs of definite days after birth were used. The urine was collected from the bladder by means of an artificial fistula, into a test tube containing a small quantity of acetic acid and thymol. At the desired intervals of time, the urine in the conducting tube was washed with a little sterile water and added to that in the collecting tube.

A gram of *indol* was next dissolved in a small quantity of alcohol and made up to 100 ml. with sterile normal saline. Twelve hours after producing the fistula, 2 ml. of the above solution per kg. of body weight, was injected intravenously. At 3 intervals of four hours the urine was collected and the amounts of indican estimated. In some cases, twelve hours after the last collection or the twenty-fourth hour specimens were also examined. During this time about 10 to 20 ml. of a 5% solution of sirupus simplex was introduced into the stomach by means of Nelaton's catheter at intervals of about four hours. With the above doses of *indol*, no toxic symptoms were manifested, and there were no signs of weakness in the animals even twenty-four hours after the experiment.

In the estimation of indican, the method of Endo (1930) was followed. This is based on Takeuchi's modification of Jolles's qualitative test for indican.

2. *The quantity of indican in the urine of the infant.*

Although Hochsinger (1890) and others believe that indican cannot be demonstrated in the urine of infants, the opposite view has been taken by Cruse (1877), Porcher and Hervieux (1907), Reuss (1911), and Takeuchi (1917). However, there are still a number of theories as to the reasons for its presence in the urine and foetal blood, such as those of Rübsamen (1918), Shibayama (1925), and Hensel (1930).

Regarding this, the writer (1936) examined the urine of infants (human) for the presence of indican, following the method of Takeuchi. Out of more than 20 such examinations only 4 cases



gave faintly positive reactions; however, on subcutaneous injections of *indol* in some of the negative cases, it was possible to demonstrate the appearance of indican in the urine collected the following day. No attempt was made at that time, to investigate the amount of synthesized product after the introduction of *indol*, but it is certain that the power of synthesising indican is present in these cases.

In conducting loading tests with *indol*, it is obvious that to obtain a true picture of the real state of affairs, it is necessary to estimate the quantity of indican normally present in the urine. Accordingly, the urine collected in the twelve-hour period from the time of the production of the fistula to the introduction of the *indol* was estimated for its indican content. This figure was subtracted from each of the later specimen results.

From the figures in Table I a very poor excretion is shown for the first two days of life. Thereafter the quantity excreted remains in the neighbourhood of about 0.2 mg., until about a month or more after birth.

TABLE I.  
Excretion of Indican in Dogs without Introduction of Indol.

Exp. No.	Days after birth	Amount of indigo in 24 hours (mg)	Amount of indican in 24 hours (mg)	Amount of indol in 4 hours (mg)
1	2	0.013	0.025	0.002
2	2	0.020	0.038	0.003
3	3	0.023	0.044	0.003
4	3	0.008	0.015	0.001
5	3	0.009	0.017	0.001
6	5	0.106	0.203	0.016
7	5	0.155	0.297	0.023
Average			0.091	
8	10	0.069	0.132	0.010
9	10	0.111	0.213	0.017
10	11	0.105	0.201	0.016
11	11	0.028	0.054	0.004
12	12	0.049	0.094	0.007
13	12	0.170	0.326	0.025
14	13	0.237	0.454	0.035
15	13	0.094	0.180	0.014
16	13	0.053	0.102	0.008
Average			0.195	

Exp. No.	Days after birth	Amount of indigo in 24 hours (mg)	Amount of indican in 24 hours (mg)	Amount of indol in 4 hours (mg)
17	21	0.118	0.226	0.018
18	21	0.508	0.974	0.076
19	21	0.056	0.107	0.008
20	21	0.082	0.157	0.012
21	23	0.037	0.071	0.005
22	22	0.122	0.234	0.018
23	22	0.029	0.056	0.004
24	23	0.028	0.054	0.004
25	24	0.039	0.075	0.006
Average			0.217	
26	30	0.030	0.058	0.005
27	32	0.202	0.387	0.030
28	30	0.053	0.102	0.008
29	30	0.067	0.128	0.010
30	31	0.084	0.161	0.013
31	33	0.054	0.104	0.008
32	35	0.183	0.351	0.027
33	35	0.309	0.592	0.046
Average			0.235	
39	Adults	3.372	6.464	0.502
40	Adults	7.034	13.484	1.048
41	Adults	3.696	7.085	0.551
42	Adults	4.668	8.949	0.695
43	Adults	3.574	6.851	0.532
Average			8.566	

### 3. Indol loading tests.

#### A. Adults.

When *indol* is introduced experimentally into adults, there follows an increased excretion of indican, which in mature dogs has been variously calculated by different workers, 16–17% (Jaffe, 1877), 45–48% (Wang, 1899), 10–20% (Olivet, 1929) and 35–45% (Hirai, 1936).

Regarding the rate of excretion of indican to the time after introduction of the *indol*, Olivet believes that after an intravenous injection of *indol* the maximum excretion occurs in the first four hours and is completed by the end of twenty four hours. Jaffe found that after subcutaneous injection, the major portion

was excreted in the first twelve hours, and completed by the end of twenty four hours.

As a preliminary to the main experiment, control tests on the power of mature dogs to synthesise indican were performed and the results are indicated in Table II. The average total amount of indican excreted within twelve hours after introduction of the *indol* was 36.94%. The amounts excreted within twenty four hours were 32.40%, 44.20%, and 45.20%. These approximated the results of Wang (1899) and Hirai (1936).

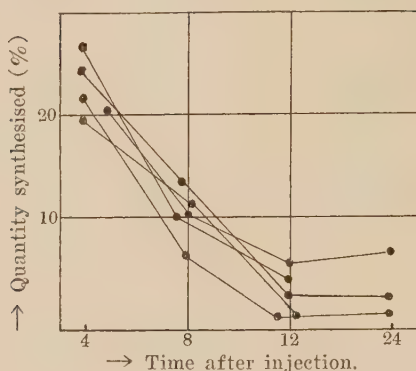
TABLE II.  
Synthesis of Indican in mature Dogs after Injection of *Indol*.

Exp. No.	Body Weight (g)	Sex	Site and Amount injected (mg)	Normal quantity of indol in 4 hours. (mg)	0-4 hour (%)	4-8 hour (%)	8-12 hour (%)	12-24 hour (%)	First 12-hour period (%)
39	5300	♀	100.0 Subcut.	0.502	22.35	6.50	1.45	2.10	30.30
40	15000	♀	300.0 V. Saphen.	1.048	20.20	11.70	1.70		33.60
41	9000	♀	180.0 Subcut.	0.551	20.75	10.95	5.50	1.88	37.20
42	5550	♀	110.0 V. Saphen.	0.695	27.10	10.10	4.30	3.70	41.50
43	7100	♀	140.0 Subcut.	0.532	25.00	13.55	3.55		42.10
Average				0.666	23.08	10.56	3.10	2.56	36.94

The course of excretion is next indicated in Chart I, showing that the greatest amount (average 23.08%) was excreted in the first four hours, about half this amount (average 10.56%) in the succeeding four-hour period. For the next four hours the average was 3.10% and for the twelve-hour period following this, only 2.56%. The results corresponded with those of Olivet and others.



Chart I.  
Excretion of indican in adult dogs.



B. Young dogs.

(a) The rate of excretion in dogs 1 to 5 days old are indicated in Table III. In the first twelve hours the amounts excreted showed a minimum of 4.15%, a maximum of 7.70% with an average of 5.77%, representing one sixth roughly of the percentage capacity of mature dogs.

TABLE III.  
Synthesis of Indican in Dogs of 1 to 5 days old after Injection of *Indol*.

Exp. No.	Days after birth	Body weight (g)	Sex	Amount injected (mg)	Normal quantity of indol in 4 hrs (mg)	0-4 hour (%)	4-8 hour (%)	8-12 hour (%)	12-24 hour (%)	First 12-hr. period (%)
1	2	200	♀	4.0	0.002	0.80	2.55	0.80		4.15
2	2	250	♀	5.0	0.003	2.70	2.05	2.95	1.90	7.70
3	3	340	♀	7.0	0.003	0.55	2.05	2.00	4.85	4.60
4	3	360	♂	7.0	0.001	0.50	1.80	1.90	3.95	4.20
5	3	385	♀	8.0	0.001	1.50	2.20	3.75	4.80	7.45
6	5	435	♂	9.0	0.016	2.45	2.50	1.10		6.05
7	5	442	♀	9.0	0.023	3.05	2.40	0.80		6.25
Average					0.007	1.65	2.22	1.9	3.88	5.77

In the course of its excretion the results also showed a different

picture. In cases one, three, four and five the amounts excreted in the second four-hour period exceeded that in the first, while in cases three, four and five the excretion in the last twelve hours still showed fairly high figures (See Chart II). In cases six and seven, the curve of excretion resembled that of adult dogs but the differences in excretion between the first and second four-hour periods were not so marked. (See Chart III). Case two maintained an intermediate attitude, the fluctuations being very slight.

Chart II.

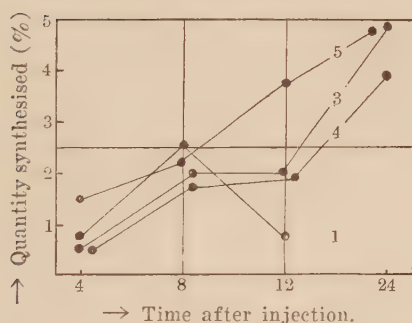
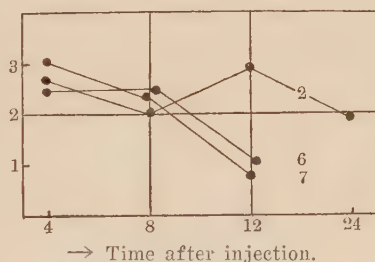


Chart III.



(b) The results of animals 10-13 days old are indicated in Table IV and show a minimum excretion in the first twelve hours of 9.85%, a maximum of 21.76% and an average of 15.66%. These were about two to three times that of the previous set of animals but were still short of the adult figures.

As regard the course of excretion cases eleven, twelve, fifteen and sixteen (Chart IV) followed an excretory curve closely resembling that of adults, but there were others (cases eight and nine) in which the quantities excreted in the first and second four-hour periods differed only slightly, while in case fourteen the amounts for the second and third four-hour periods were practically equal, and in case thirteen the excretions for all three periods were almost the same. In the course of its excretion case ten resembled younger animals of one to five days old. (See Chart V).

TABLE IV.  
Synthesis of Indican in Dogs 10-13 days old after Injection of *Indol*.

Exp. No.	Days after birth	Body weight (g)	Sex	Amount injected (mg)	Normal quantity of indol in 4 hrs. (mg)	0-4 hour (%)	4-8 hour (%)	8-12 hour (%)	12-24 hour (%)	First 12-hour period (%)
8	10	225	♀	4.5	0.010	10.12	8.24	3.40	2.16	21.76
9	10	325	♂	6.5	0.017	9.41	8.24	2.48		20.13
10	11	527	♂	10.5	0.016	3.65	4.85	1.85		10.35
11	11	532	♀	10.5	0.004	8.45	4.10	0.85		13.40
12	12	637	♂	12.5	0.007	6.90	3.70	1.20		11.80
13	12	830	♀	16.5	0.025	3.95	3.40	2.50		9.85
14	13	445	♀	9.0	0.035	7.60	5.15	4.65		17.40
15	13	555	♂	11.0	0.014	10.10	6.45	3.05		19.60
16	13	595	♀	12.0	0.008	9.05	4.80	2.80		16.65
Average					0.015	7.69	5.44	2.53		15.66

Chart IV

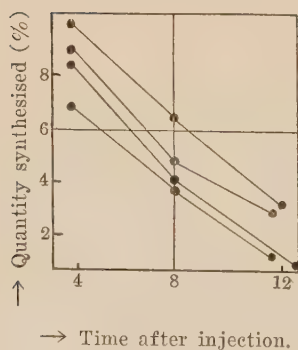
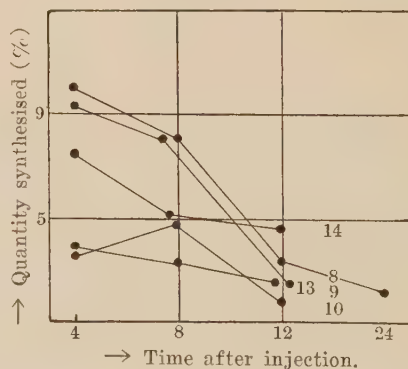


Chart V.



(c) With animals twenty-one to twenty-four days old, the results of nine cases (Table V) showed a minimum excretion of 8.40%, a maximum of 20.6% and an average of 14.97%, in the first twelve-hour periods. These were also very similar to that of the previous set of animals of ten to thirteen days old.

The course of excretion, however, approximated the adult type



TABLE V.  
Synthesis of Indican in Dogs 21-24 days old after Injection of *Indol*.

Exp. No.	Days after birth	Body weight (g)	Sex	Amount injected (mg)	Normal quantity of indol in 4 hrs (mg)	0-4 hour (%)	4-8 hour (%)	8-12 hour (%)	12-24 hour (%)	First 12-hour period (%)
17	21	567	♂	11.0	0.018	16.20	3.15	0.45	0.25	19.80
18	21	585	♀	12.0	0.076	14.68	3.96	1.96	0.76	20.60
19	21	675	♀	14.0	0.008	11.70	5.30	1.75	1.10	19.15
20	21	680	♀	14.0	0.012	6.20	4.30	1.40		11.90
21	23	630	♂	8.8	0.005	8.80	1.30	2.10		12.20
22	22	670	♀	13.0	0.018	9.60	3.10	0.90		13.60
23	22	650	♀	13.0	0.004	12.40	1.30	0.70		14.40
24	23	700	♂	14.0	0.004	6.50	1.60	0.30		8.40
25	24	920	♀	18.0	0.006	11.20	3.15	0.35		14.70
Average					0.017	10.81	3.02	1.10	0.70	14.97

and in most of the cases showed a maximum excretion in the first four hours, decreasing to less than half of this in the next four hours and still less in the next. (See Chart VI).

(d) In the case of animals thirty to thirty-five days old Table VI), the

minimum excreted was 11.65%. The maximum 22.85% with an average of 14.82% for the eight cases examined. However, compared with dogs ten to thirteen days old, a point of note was that the amount of indican excreted in the first four hours was comparatively large and that after this a rapid drop took place. (See Chart VI). In short, the excretory curve was similar to that of adult dogs.

Chart VI.

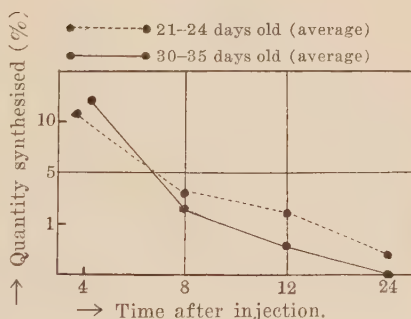


TABLE VI.  
Synthesis of Indican in Dogs of 30-35 days old after Injection of *Indol*.

Exp. No.	Days after birth	Body weight (g)	Sex	Amount injected (mg)	Normal quantity of indol in 4 hrs. (mg)	0-4 hour (%)	4-8 hour (%)	8-12 hour (%)	12-24 hour (%)	First 12-hour period (%)
26	30	692	♀	14.0	0.005	20.80	1.90	0.15	0.5	22.85
27	32	660	♂	13.0	0.030	16.50	2.30	2.90		21.70
28	30	900	♀	18.0	0.008	11.10	1.90	0.45		13.45
29	30	950	♀	19.0	0.010	10.80	1.00	0.40		12.20
30	31	1050	♂	20.0	0.013	9.30	2.30	1.00		12.60
31	33	1440	♀	29.0	0.008	9.60	1.75	0.30		11.65
32	35	970	♂	19.5	0.027	10.05	0.95	0.70		11.70
33	35	1220	♂	24.5	0.046	9.40	1.85	1.15		12.40
Average					0.018	12.19	1.74	0.88	0.5	14.82

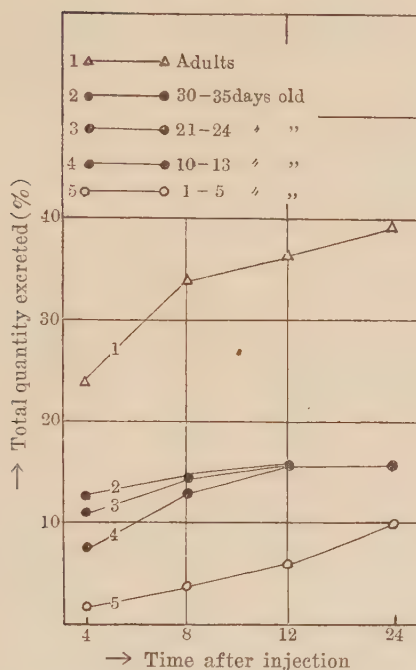
### III. DISCUSSION AND SUMMARY.

As reported by previous investigators, Masson (1874), Niggeler (1875), Jaffe (1877), Wang (1899), Kaufmann (1911), the introduction of *indol* into animals was followed by a portion of it being synthesised into indican but the fate of the rest could not be ascertained.

In the adult dog the amount of indican excreted in the first twelve hours after the injection of *indol* showed an average of about 37% which decreased the younger the animal. Thus, in dogs one to five days old, the excretion was very poor, and in dogs ten to thirty-five days old, the figures were still less than half that of adults. This is probably due to the power of synthesising indican being poor in these suckling puppies when compared with mature animals. (Chart VII). This inferiority is especially marked in those from birth to 5 days.

In the course of its excretion after the injection of *indol*, in dogs of thirty to thirty-five days, most of the indican was excreted in the first four hours. Thereafter the quantities fell rapidly with each succeeding four-hour period. In dogs twenty-one

Chart VII.



to twenty-four days old, the amount excreted in the first four hours was lower than that for the corresponding period of the former set of animals. In the succeeding periods the figures were higher. In younger dogs (ten to thirteen days) excretion in the first four hours was much poorer than in the older animals while the amount excreted in the succeeding hours varied in different animals. In some there was a rapid fall, in others the fall was more gradual, while in certain others there was a rise. In the very young dogs from birth to five days the amounts excreted in the first four hours were extremely poor but in the majority of cases tended to increase with the succeeding hours. In some, however, the amounts excreted remained practically the same or slightly decreased, but the fall in each case, if present, was gentle.

In short, the amount excreted in the first four hours, whether in the maximum, minimum or average figures, tended to increase



with the age of the animals (Chart VII) while that excreted in the succeeding four-hour periods was greater in the younger animals. It is difficult to say whether such a tendency be due to poor or delayed synthesis of indican in the liver or lungs or to its poor excretion by the kidneys.

Here, a point to be noted is that though the amounts synthesised in the first twelve hours by dogs of ten—thirteen and twenty-one—twenty-four days old are the same, the course of excretion in the former is much more gradual than in the latter. Again, it is interesting to note that since the report of Obermayer and Popper (1911), most investigators have agreed that with a dysfunction of the kidneys, there follows a resulting accumulation of the indican synthesised in the blood (Rosenberg (1916), Ueda (1922), Kishi (1928), Inoue (1934), Honda (1935)).

The writer was able to show by tests with indigocarmine and phenolsuphonephthalein, that the excretory power of the kidneys of young dogs was poor. Hence, it is probable that in these cases the low excretion after the introduction of *indol* is due, both to the poor and delayed synthesis of indican in the liver and lungs and to its poor excretion by an accompanying dysfunction of the kidneys.

#### IV. CONCLUSION.

1. The daily average amount of indican excreted in adult dogs is as much as 8.6 mg., while in suckling puppies it is about 0.2 mg., and this is further decreased to as low as 0.03 mg (average) in those one or two days old.

2. (a) The average quantity of indican synthesised in the first twelve hours after loading tests with *indol* is 5.8% in dogs one to five days old, about 15% in dogs ten to thirty-five days old, and 37.0% in adult dogs.

(b) After the introduction of *indol*, the quantity of indican excreted in the first four hours increases with the age of the animals, while that excreted in the succeeding four-hour periods tended to increase with the youth of the animals. This tendency

was especially marked in dogs from birth to 10-13 days old.

3. The poor synthesis and excretion of indican in these infant dogs is due (1) to an inferior oxidising and synthesizing function of the liver and lungs, and (2) to an excretory dysfunction of the kidneys.

4. The power of disposing *indol* is markedly improved in the period from birth to ten to thirteen days and thereafter.

## REFERENCES.

- Cruse, P. (1877): Jahrsb. f. Kinderheilk., **11**, 393.  
Endo, M. (1930): Tokyo Ijishinshi, No. **2699**, 2441.  
Hensel, S. (1930): Zeitschr. f. Geb. u. Gyn., **98**, 276.  
Hirai, T. (1936): Dai nippon Jibiinkokagakukaikaiho, **42**, 1219 and Manshu Igakukai Zasshi, **25**, 789.  
Honda, I. (1935): Jikken Shokakibyogakukai Zasshi, **10**, 788.  
Ikeyama, K. (1931): Nagasaki Igakukai Zasshi, **9**, 736.  
Inoue, H. (1933-1934): Chosen Igakukai Zasshi, **23**, 1239 and **24**, 1171.  
Jaffe, M. (1877): Virchow's Archiv, **70**, 72.  
Kimura, N. (1934): Igakukenkyu, **8**, 535.  
Kishi, Y. (1928): The Tohoku J. of Exp. Med., **11**, 504.  
Nakatani, K. (1927): Osaka Igakukai Zasshi, **26**, 1139.  
Olivet, J. (1929): Zeitschr. f. klin. Med., **110**, 195.  
Obermayer, Fr. u. H. Popper (1911): Zeitschr. f. klin. Med., **72**, 332.  
Reuss, A. v. (1911-1914): Zeitschr. f. Kinderheilk., **3**, 12 u. **11**, 3.  
Rosenberg, M. (1916-1920): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **79**, 265 u. **86**, 15.  
Rübsamen (1918): Zentralbl. f. Gynäkol., **21**, 350.  
Sawada, T. (1925): Nippon Naikagakukai Zasshi, **15**, 174, 490.  
Shibayama, K. (1925): Nippon Fujinkagakukai Zasshi, **20**, 729.  
Shōji, T. (1936): Taiwanigakukai Zasshi, **35**, 333.  
Takeuchi, K. (1917): Tokyo Igakukai Zasshi, **31**, 1228, 1233.  
Wang, E. (1899): Zeitschr. f. physiol. Chem., **27**, 557.  
Ueda, H. (1922): Chugai Ijishimpo, No. **1003-1026**, 463.





## BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER GALLENSÄUREN VON FISCHGALLE.

### Maguro-Fisch (*Thynnus thynnus*) und Ishinagi-Fisch (*Stereolepis ishinagi*).

VON

TOSHIO SHIMADA.

(Aus dem physiol.-chemischen Institut der „Nippon“ Medizin-Hochschule,  
Tokio. Vorstand: Prof. Dr. K. Kaji.)

(Eingegangen am 19. April, 1937).

Nach den Ergebnissen der bisherigen Untersuchungen, insbesondere den eingehenden Arbeiten der Schüler von Prof. Dr. T. Shimizu besteht die Gallensäure der Fischgalle hauptsächlich aus Taurocholsäure (Näheres darüber siehe bei T. Shimizu: Chemie und Physiologie der Gallensäuren, 1936!). Nur ausnahmsweise konnten aus Fischgalle, Scymnol  $C_{27}H_{46}O_5$ , (aus Haifisch 1898 u. 1925) und Taurochenodesoxycholsäure (aus Mugil, 1935) isoliert werden. Es scheint immer noch wünschenswert, weitere Angaben über die Gallensäure der verschiedenen Tierarten zu erhalten, um endgültige Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen Nahrungsbestandteilen und Gallensäure zu gewinnen. In dieser Arbeit wurde die Gallensäure des Maguro- und Ishinagi-Fisches untersucht und, wie im Versuchsteil ermittelt, gefunden, dass in beiden Fällen, die Gallensäure fast ausschliesslich aus Cholsäure, bzw. Taurocholsäure besteht.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

##### 1. Gallensäure der Maguro (*Thynnus thynnus*)-Galle.

Die Galle aus 5550 Gallenblasen (Gallenmenge, ca 11000 ccm) wurde mit dem 3 fachen Volumen Alkohol gemischt, erwärmt, und von den ausgefällten Muzinen abfiltriert. Die alkoholische Gallenlösung, die nur schwach sauer gegen Lackmus reagierte,

wurde zu Syrup eingeeengt, in warmes Wasser aufgenommen und 2 mal mit Äther ausgeschüttelt, um die beigemengten Fette, Cholesterin und die Fettsäuren zu entfernen. Die wässrige Lösung wurde dann mit so viel Kalilauge versetzt, bis die Alkalimenge eine Konzentration von 10% erreicht hatte, und dann 6 Std. lang bei 120°C hydrolysiert. Die hydrolysierte Lösung wurde zunächst unter Ansäuerung mit HCl bis kongosauer mit viel Äther durchgeschüttelt. Nach 4 maligem Ausschütteln mit erneutem Äther gingen die Gallensäuren fast vollständig in das Lösungsmittel über. Beim Einengen der Ätherlösung wurde die Cholsäure in Form von schwach gefärbten Krystallen ausgeschieden, die sich nach dem Waschen mit Äther leicht aus verdünntem Alkohol umkristallisieren liessen. (Bearbeitung des in Äther leicht löslichen Anteiles wird weiter unter beschrieben). Ausbeute: 17,5 g Fp. 198°C. Die Eigenschaften der gewonnenen Säure stimmten mit der von reiner Cholsäure gut überein. (Löslichkeitsverhältnisse, Krystallform, Schmelzpunkt, Reaktion nach Pettenkofer, Liebermann, Mylius, und modifizierte Hammersten-Reaktion nach Yamasaki u.s.w., Mischschmelzpunkt zeigt auch keine Depression).

0,1039 g Subst. in 10 ccm Alkohol.  $l=2$ ,  $\alpha = +0,75^\circ$ .  
 $[\alpha]_D^{30} = +36,09^\circ$ .

#### Titration:

0,1006 g Subst. verbrauchten 2,44 ccm  $n/10$  NaOH, Phenolphthalein als Indikator.

Äquivalent:	Ber. für $C_{24}H_{40}O_5$	408
	Gef.	412

#### Analyse:

5,274 mg Subst.	13,682 mg $CO_2$	4,732 mg $H_2O$
5,160 mg Subst.	13,400 mg $CO_2$	4,615 mg $H_2O$
Ber. für $C_{24}H_{40}O_5$	C 70,54	H 9,87
Gef.	C 70,75, 70,82	H 10,04, 10,01

#### Analyse des Methylesters (Fp. 153°C).

5,394 mg Subst.	14,107 mg $CO_2$ u.	4,820 mg $H_2O$
Ber. für $C_{25}H_{42}O_5$	C 71,035	H 10,002
Gef.	C 71,33	H 10,00

Die aus obigem Präparat durch Oxydation mit  $\text{CrO}_3$  gewonnene Dehydrosäure schmilzt bei  $236^\circ\text{C}$ . Mischschmelzpunkt mit reiner Dehydrocholsäure zeigt keine Depression.

*Analyse der Dehydrosäure:*

5,412 mg Subst.	14,119 mg $\text{CO}_2$ u.	4,200 mg $\text{H}_2\text{O}$
5,622 mg Subst.	14,638 mg $\text{CO}_2$ u.	4,279 mg $\text{H}_2\text{O}$
Ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$	C 71,59	H 8,51
Gef.	C 71,15, 71,01	H 8,68, 8,52

Methylester der Dehydrocholsäure schmilzt bei  $243^\circ\text{C}$ .

Aus der in Äther leicht löslichen Fraktion, die die Mutterlauge der Cholsäure ist, liess sich noch eine weitere Ausbeute an Cholsäure, durch fraktionierten Auszug mit Phosphatpuffer (pH 6,8, 7,7, 8,3 und 8,6.) gewinnen (ca. 1,6 g). Aus den Pufferfraktionen von pH 6,8 und 8,6 liess sich nur ein wenig Gallensäure isolieren, die nicht zur Krystallisation gebracht werden konnte.

*Cholesterin.*

Die Ätherfraktion, die vor der Hydrolyse aus wässriger Gallenlösung gewonnen wurde, wurde mit verd. NaOH bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und geschüttelt. Die Ätherschicht wurde verdampft, der Rückstand mit alkoholischem Kali hydrolysiert. Aus dem unverseifbaren Anteil liessen sich ungefähr 2,0 g krystallisiertes Cholesterin gewinnen. Fp.  $146^\circ\text{C}$ . Positive Salkowskische und Liebermann-Burchardsche Reaktion. Dibromverbindung von Fp.  $123^\circ\text{C}$ .

*Anhang: Isolierung von Tyrosin.*

Aus dem die Muzine enthaltenden, in Alkohol unlöslichen Gemisch wurde Tyrosin isoliert, das in verdünntem Ammoniak gelöst, durch HCl-zusatz flockig ausgefällt und aus heissem Wasser in feinen seidenglänzenden Nadeln umkrystallisiert wurde. Millonsche, Piriasche und Denigesche Reaktion fielen sämtlich positiv aus. Ausbeute 5,1 g.

Das Vorkommen des Tyrosins in freiem Zustand in der natürlichen Galle in einer so grossen Menge, dass man sie so leicht isolieren kann wie hier, ist kaum zu denken. Wahrscheinlich stammte die Aminosäure aus dem Gallenblasenprotein und zwar



aus Autolyse derselben her, obwohl die Präparate in Alkohol in der Kälte aufbewahrt worden waren.

2. *Gallensäure der Ishinagi (Stereolepis ishinagi)-Galle.*

4900 ccm Galle wurden genau wie die Maguro-Galle bearbeitet und so daraus Cholsäure, Cholesterin, Taurin und wenig, nicht kristallisierbare Gallensäuren, deren Bariumsalz allerdings in Wasser unlöslich ist, isoliert.

*Cholsäure:* Ausbeute ca. 11,1 g Fp. 198°C. Keine Depression beim Mischversuch. Positive Pettenkofer- u. Mylius-Reaktion, sowie Hammersten-Reaktion nach Yamasaki.

*Spez. Drehung.*

0,0945 g Subst. in 10 ccm Alkohol.  $l = 2$  dm  $\alpha = +0,69^\circ$   
 $[\alpha]_D^{30} = +36,5^\circ$

*Titration:*

0,1029 g Subst. verbrauchten 2,48 ccm  $n/10$  NaOH  
 Äquivalent: Ber. für  $C_{24}H_{40}O_5$  408  
 Gef. 414,9

*Analyse:*

3,525 mg Subst.	9,110 mg $CO_2$ u.	3,080 mg $H_2O$
3,620 mg Subst.	9,380 mg $CO_2$ u.	3,160 mg $H_2O$
Ber. für $C_{24}H_{40}O_5$	C 70,54	H 9,87
Gef.	C 70,48, 70,67	H 9,78, 9,77

*Analyse des Methylesters.*

4,774 mg Subst.	12,478 mg $CO_2$ u.	4,352 mg $H_2O$
5,219 mg Subst.	13,612 mg $CO_2$ u.	4,750 mg $H_2O$
Ber. für $C_{25}H_{42}O_5$	C 71,35	H 10,002
Gef.	C 71,29, 71,13	H 10,20, 10,18

*Dehydrocholsäure.* Fp. 236°C.

*Analyse:*

3,860 mg Subst.	10,130 mg $CO_2$ u.	2,960 mg $H_2O$
4,100 mg Subst.	10,755 mg $CO_2$ u.	3,135 mg $H_2O$
Ber. für $C_{24}H_{34}O_5$	C 71,59	H 8,51
Gef.	C 71,57, 71,54	H 8,58, 8,56

*Taurin.*

Aus der Hydrolysenmutterlauge liessen sich ca. 2,0 g Taurin

durch die übliche Methode nach Salkowski isolieren. Fp. über 290°C. Die physikalischen Eigenschaften der Substanz stimmen mit der des Taurins überein.

*Analyse:*

3,195 mg u. 2,206 mg Substanz

P. 759,0 u. 770,0 T. 19°C u. 16°C

V. 0,30772 u. 0,2058

Ber. für  $C_{27}H_{47}O_6SN$  N 11,19

Gef. N 10,00 u. 10,97

*Cholesterin.*

Ausbeute, ca. 0,8 g Fp. 146°C. Reaktionen nach Liebermann-Burchard und nach Salkowski fallen positiv aus. Dibromverbindung, Fp. 122°C.

Weitere Identifizierung eines Gallensäurengemisches, das nur einige Zentigramme betrug und allerdings ein schwer lösliches Basalz liefert, wurde wegen Mangel an Material unterlassen.

Der Gehalt an Cholsäure in beiden Fischgallen ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

	Stereolepis ishinagi	Thynnus thynnus
Zahl der Gallenblasen	981	5546
Menge der Galle	ca 4900 ccm	ca 11000 ccm
Cholsäure	11,1 g (0,23 g/dl)	19,1 g (0,17 g/dl)
Cholesterin	ca 0,8 g	ca 2,0 g

LITERATUR.

Hammersten, O. (1898): H., 24, 322.

Oikawa, S. (1925): J. of Bioch., 5, 63.

Shimizu, T. (1936): Chemie und Physiologie der Gallensäuren, Okayama.

Watanabe, K. (1935): J. of Bioch., 22, 119.



## STUDIES ON LIPASE. IV.

### Effects of Reduction and Oxidation on the reversible Action of Pancreatic Lipase and Pro-Lipase.

BY

RYOJI ITOH AND TAKEO NAKAMURA.

*(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,  
Fukuoka. Director: Prof. K. Kodama.)*

(Received for publication, April 20, 1937)

The present paper describes the experiments carried out with the view to elucidate the effect of reduction and oxidation upon the hydrolytic as well as the synthetic reaction of fat by pancreatic lipase and pro-lipase. The result obtained with the enzyme from animal origin is essentially the same as in the case of ricinus-lipase, namely the hydrolytic reaction is augmented by reduction and retarded by oxidation, while the synthesis of fat from glycerol and oleic acid is augmented by oxidation and retarded by reduction. Further, it was observed that in both hydrolytic as well as synthetic reactions the augmentation is not proportional with the rise of reduction and oxidation, but the maximum augmentation exists in a certain redox degree, that is to say, the hydrolytic and synthetic reactions seem to have an optimal redox potential respectively.

As shown by O. Rosenheim and his co-worker (1910) pro-lipase had no activity of lipolysis, but we found some interesting facts in the pro-lipase that it had a considerable action of synthesis itself and that the lipolytic action reappeared by reduction. From this fact we are led to assume that the pro-lipase is prepared in a highly oxidised state, which is favourable for synthesis but not for hydrolysis.

Another interesting fact found in the experiments studying the relationship between redox potential and lipase action is the effect of protein upon lipase. It is usually assumed that lipase



especially prolipase, is greatly activated by the presence of protein. Though the essential significance of protein in this case is regarded as still obscure, yet one of the most prevailing and plausible explanations seems to be the colloidal nature of protein, which serves as a carrier of enzyme as well as a substrate thus bringing both reactants into more intimate connection. But it should be reminded that the degree of activation of lipase by protein depends to a considerable extent upon the sorts and nature of protein. The higher the reduction potential of the protein, the greater is the augmentation in lipolytic activity. Therefore, the increase in the lipolytic activity by the presence of protein may be partially due to the effect of reducing action of the protein.

#### EXPERIMENTALS.

##### *I. Effect of $H_2O_2$ on the hydrolytic as well as synthetic reaction by pancreatic lipase and pro-lipase.*

The enzyme preparation used in this study was the glycerol extract of the dry powder of hog pancreas prepared by the method of R. Willstätter and his co-workers (1923).

The hydrolytic reaction was carried out in a conic flask of 50 cc. volume which was subsequently used as a titration vessel. 2.0 cc. olive oil, 0.15 cc. enzyme preparation, 1.0 cc.  $H_2O_2$  of various concentration, as shown in the table I, 9.85 cc.  $H_2O$  were pipetted into this flask, and the flask was stoppered, shaken three minutes vigorously and placed in a thermostat kept at  $37^\circ C$  for 6 hours. At the end of this reaction time 10 cc. ethylalcohol and 10 cc. ether were added into this flask and the liberated free acids were titrated with  $N/10$  KOH alcoholic solution using phenolphthalein as an indicator. Control tests were carried out adding 1.0 cc.  $H_2O$  instead of 1.0 cc.  $H_2O_2$ .

The synthetic reaction was studied in the system containing 0.5 cc. oleic acid, 1.0 cc. glycerol, 1.0 cc.  $H_2O$  and 5.0 cc. glycerol extracts of pancreas lipase. They were shaken well at the beginning of the experiment as described above. The reaction temperature was  $37^\circ C$  and the reaction time was 16 hours; at the

end of this time the oleic acids which remained unsynthesized were titrated as described in the foregoing experiment. Control tests were carried out adding 1.0 cc.  $\text{H}_2\text{O}$  instead of 1.0 cc.  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

The pancreatic pro-lipase was prepared by the method of D. L. Woodhouse (1932) and employed in the synthetic reaction as a glycerol extract and in the hydrolytic reaction as a watery suspension.

In the synthetic reaction, the reaction mixture was 0.5 cc. oleic acid, 1.0 cc. glycerol, 0.5 cc.  $\text{H}_2\text{O}$ , 2.0 cc. glycerol extract of pro-lipase, and 1.0 cc.  $\text{H}_2\text{O}_2$  of various concentration as in table I. The reaction time was 24 hours and the reaction temperature was  $37^\circ\text{C}$ . In the hydrolytic reaction the reaction mixture was 2.0 cc. olive oil emulsion, 1.0 cc.  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 cc. watery suspension of pro-lipase, and 1.0 cc.  $\text{H}_2\text{O}_2$  of various concentration as in table I. The olive oil emulsion was prepared by adding 3.75 cc. of 7.5% sodium oleate to 100 cc. of olive oil.

TABLE I.

Effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on the synthetic as well as hydrolytic reaction by pancreatic lipase and pro-lipase.

$\text{H}_2\text{O}_2$ concentration in normal	Lipase		Pro-lipase	
	Degree of hydrolysis in %	Degree of synthesis in %	Degree of hydrolysis in %	Degree of synthesis in %
0	17.5	18.4	0	25.8
0.0001	17.2	18.8	0	25.9
0.0005	—	20.3	—	25.9
0.0025	16.8	—	0	25.8
0.0050	15.5	27.6	—	19.6
0.0100	14.9	—	—	11.3
0.0200	—	32.2	0	8.1
0.0600	8.6	27.0	—	—
0.1200	—	22.7	—	6.1
0.3000	5.6	—	0	—
1.0000	4.3	10.5	—	—
3.0000	4.2	8.8	0	—

As will be seen from table I the hydrogen peroxide in the lower concentration causes a progressively increasing augmentation of synthesis with increasing concentration of  $H_2O_2$ , and the synthetic reaction reaches a maximum degree, i.e. maximum augmentation, at the concentration of 0.02 N of  $H_2O_2$ , beyond which it exerts an inhibiting action on the process of fat synthesis. On the other hand the hydrolytic reaction is inhibited, proportional with the concentration of hydrogen peroxide. In the synthetic experiment of pro-lipase it is found that the pro-lipase has a synthetic activity itself, and is indifferent for  $H_2O_2$  in lower concentrations but in high concentrations the synthesis is inhibited.

*II. Effect of reduced glutathione on the hydrolytic as well as synthetic reaction by pancreatic lipase and pro-lipase.*

The reduced glutathione was added as a powdered form as in table II and well mixed. The reaction mixture was 3.0 cc.

TABLE II.  
Effect of reduced glutathione on the hydrolytic reaction by pancreatic lipase and pro-lipase.

Reduced glutathione added in mg	Lipase		Pro-lipase
	Degree of hydrolysis in %		Degree of hydrolysis in %
	pH = 5.6	pH = 6.0	pH = 7.0
0	7.2	14.3	0
0.5	7.6	14.9	0.9
1.0	—	17.5	1.4
2.0	8.6	18.9	1.9
2.5	9.0	20.2	—
5.0	9.6	21.2	2.9
7.5	—	20.8	—
10.0	10.6	19.2	3.4
12.5	11.2	—	3.9
15.0	11.6	17.1	4.5
17.5	10.8	15.6	—
20.0	10.1	14.8	5.7
25.0	9.8	—	6.2

pancreatic lipase, 2.0 cc. olive oil, 3.0 cc. phosphate buffer solution of pH 5.6 and pH 6.0 respectively and 2.0 cc. distilled water.

In the lipolysis of pro-lipase 1.0 cc. phosphate buffer solution of pH 7.0 was added and other experimental conditions were the same as described in the foregoing experiment. As shown in the tabel II a certain amount of reduced glutathione has a maximum augmentation at pH 5.6 and pH 6.0 respectively in the lipolytic reaction by lipase, and the hydrolytic activity of pro-lipase has reactivated by reduced glutathione, and the activation degree was proportional with the amount of reduced glutathione added.

The synthetic reaction was retarded by reduced glutathione, and the inhibiting degree was proportional with the amount of reduced glutathione added as shown in Table III.

TABLE III.  
Effect of reduced glutathione on the synthetic reaction by  
pancreatic lipase and pro-lipase.

Reduced glutathione added in mg	Lipase	Pro-lipase
	Degree of synthesis in %	Degree of synthesis in %
0	26.2	24.8
0.5	—	24.9
1.0	25.1	—
2.0	24.8	23.6
2.5	—	21.1
5.0	23.7	19.0
7.5	23.1	—
10.0	22.5	—
15.0	21.0	14.2

### *III. Effect of reduction by hydrogen gas in presence of platinum asbestos.*

The reaction was carried out in a Thunberg's vacuum tube with a flat bottom of 50 cc. volume. Into this vessel were introduced 0.5 cc. pro-lipase preparation, 1.0 cc. H<sub>2</sub>O, 2.0 cc. olive oil emulsion and a small amount of platinum asbestos, and after they



were mixed the vessel was evacuated for three minutes by means of the rotary pump and filled with hydrogen gas. After the repetition of this treatment, two times more to ensure the possible exclusion of oxygen, the vessel was put into the thermostat kept at 37°C for 24 hours. Other experimental conditions were the same as described in the foregoing experiment. In table IV the positive sign indicates the presence of platinum asbestos and hydrogen gas and the negative sign the presence of air instead of hydrogen.

As shown in table IV it is clearly demonstrated that the lipolytic activity of pro-lipase reappeared remarkably, due to the reduction by nascent hydrogen gas. The hydrolytic as well as synthetic reaction of lipase is retarded to a slight extent by the reduction of nascent hydrogen gas. In the medium of hydrogen gas without air the hydrolytic reaction is augmented but the synthetic reaction is retarded. From this fact we believe that the hydrolysis seems favourable to bring about the reaction in the medium without oxygen gas, though the synthetic reaction is favourable in the medium with oxygen.

TABLE IV.  
Effect of reduction by nascent hydrogen gas on lipase and pro-lipase action.

Platinum asbestos	Hydrogen gas	Lipase		Pro-lipase	
		Degree of hydrolysis in %	Degree of synthesis in %	Degree of hydrolysis in %	Degree of synthesis in %
—	—	22.2	13.7	0	21.2
+	—	21.9	13.6	0	21.0
+	+	20.6	12.9	13.1	20.3
—	+	23.6	13.3	0	19.7

*IV. Effect of various proteins on the lipase and pro-lipase action.*

The reaction mixture was carried out adding 1.0 cc. colloidal substances as shown in table V, 0.5 cc. pro-lipase, 1.0 cc. H<sub>2</sub>O, and 2.0 cc. olive oil emulsion; other experimental conditions were the

same as described in the foregoing experiments. Control values for lipase action of serum and other substances were deducted in each case respectively.

The co-lipase used here was prepared by boiling equal volumes of aqueous pancreas extract (1 part pancreas: 1 part  $H_2O$ ) and distilled water and filtering. The solution of ox lens was prepared by kneading in a mortar adding three times its volume of distilled water. The ox serum and egg-white were diluted two times with distilled water respectively. The protein was added after the protein content was made constant by diluting with  $H_2O$  checking nephelometrically the precipitation by the addition of trichlor acetic acid.

The potential of the protein was measured in a vessel containing 1.0 cc. of the protein solution and 3.0 cc. of phosphate buffer solution of pH 5.906. As the electrode metal, the platinum plate ( $1 \times 1$  cm.) was used and the connection with saturated calomel cells as half element was made with the KCl-agar bridge. The E.M.F.

TABLE V.  
Effect of various proteins on the lipase and pro-lipase action.

Substance added	Reduction potential Eh in mv.	Pro-lipase		Lipase
		Degree of hydrolysis in %	Degree of synthesis in %	Degree of hydrolysis in %
$H_2O$	—	0	27.6	26.4
co-lipase	172.5	6.6	25.3	29.0
ox lens	106.5	8.8	22.8	43.0
egg-white	121.5	7.1	23.0	31.6
ox serum	292.5	6.0	24.1	33.4
boiled ox serum	252.5	6.4	23.9	39.6
egg-albumin	391.5	1.1	27.5	29.8
intestine extract (boiled and filtered)	251.5	4.4	—	35.3
gall bladder extract (cholecysmon)	—	5.2	—	—
hemoglobin	—	0.1	27.6	26.5
gelatin (1%)	—	0	27.5	26.4
agar (1%)	—	0	27.5	26.5
starch (1%)	410.5	0	27.6	26.4
gum arabic (1%)	421.5	0	27.6	26.2
gum acaci (1%)	403.5	0	27.6	26.4
urine	222.5	8.0	25.1	32.5

was measured by the unipivot potentiometer of the Cambridge Instrument Company. The whole apparatus was immersed in the water bath kept at 37°C. The purified nitrogen gas was bubbled through at a constant rate, for the purpose of stirring. The potential was recalculated into Eh by adding 235.5 mv. which is the potential of the saturated calomel cell against a normal hydrogen electrode at this temperature.

As will be seen in table V, the lipase action of synthesis is retarded by proteins proportional with the rise of its reduction potential, but the hydrolysis is augmented by protein and the lipolytic action of pro-lipase reappeared in the presence of various proteins; moreover it is observed that the effect in activating the pro-lipase is associated with its reducing intensity, that is the higher the reduction potential of the substances, as ox lens, egg-white, co-lipase, urine and boiled ox serum, the greater the activating power for the pro-lipase. From these facts we are led to assume that the effect of protein on the lipase action may be partially due to its reducing action.

*V. Effect of calcium chloride on the synthetic as well  
as hydrolytic reaction by pancreatic lipase  
and pro-lipase.*

In the experiment 1.0 cc. of calcium chloride solution of the concentration as shown in the table VI was added into the reaction mixture. Other experimental conditions were the same as described in the foregoing experiments. Control tests were carried out with 1.0 cc. of distilled water instead of calcium chloride solution.

As shown in table VI the calcium chloride retards the synthetic action of lipase and pro-lipase, and augments the lipolytic action of lipase on olive oil, but none was able to activate the pro-lipase.

The effect of calcium ion in augmenting lipase action has been discussed by many investigators particularly by R. Willstätter (1929) and his co-workers, who ascribed this effect to the formation of complexes which bring the enzyme into more intimate contact with the substrate. However, the effect of calcium ion

TABLE VI.  
Effect of  $\text{CaCl}_2$  on the synthetic as well as hydrolytic reaction  
by lipase and pro-lipase.

Amount of $\text{CaCl}_2$ added in mg	Lipase		Pro-lipase	
	Degree of synthesis in %	Degree of hydrolysis in %	Degree of synthesis in %	Degree of hydrolysis in %
100	2.8	36.5	—	—
50	10.0	32.3	9.9	0
30	20.0	29.1	—	—
20	26.3	26.4	18.9	0
10	30.3	22.2	—	—
5	31.3	19.0	21.0	0
0	46.2	16.8	25.1	0

will be explained in a comprehensive manner assuming that the fatty acids which were splitted out by the enzyme may be carried away from the active field of the enzymic surface forming a water insoluble calcium salts, so that the reverse action due to the law of mass action is eliminated. In the synthetic reaction the oleic acid added in the reaction mixture may form a calcium oleate that is unfavourable for synthesis with glycerol.

#### SUMMARY.

The relationship between reduction and oxidation in the hydrolytic as well as synthetic reaction by pancreatic lipase and pro-lipase has been studied; the results are summarised as follows.

1. The hydrolytic reaction is augmented by reduction and retarded by oxidation, while the synthetic reaction is augmented by oxidation and retarded by reduction.

2. In the hydrolytic or the synthetic reaction the augmentation is not proportional with the rise of reduction and oxidation, but there exists an optimal redox potential respectively.

3. Pro-lipase itself has a considerable action of synthesis but of no hydrolysis and the latter action is revived by reduced glutathione or nascent hydrogen gas.



4. The hydrolysis seems to proceed more intensely in the medium deprived of oxygen gas, whereas its presence seems favourable for the synthetic reaction.

5. The effect of protein on the lipolytic action of lipase is much concerned with the reducing activity of protein molecule.

6. The calcium ion augments the lipolytic action of lipase and retards the synthetic action. A plausible explanation for this effect of calcium ion has been given.

The authors are greatly indebted to Prof. K. Kodama for his kind criticisms and suggestions throughout this research.

#### REFERENCES.

- Rosenheim O. and Shaw-Mackenzie J. A. (1910): *J. of Physiology*, **40**, VIII.  
Willstätter R. Waldschmidt-Leitz E. and Memmen Fr. (1923): *Z. für physiolog. Chem.* **125**, 98, 132.  
Woodhouse D. L. (1932): *Bioch. J.* **26**, 1512.

## ÜBER DEN ABBAU DER *d*-GLUKOSAMINSÄURE DURCH MIKROORGANISMEN UND IM TIERORGANISMUS.

VON

MITZIMASA IMAIZUMI.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut d. Medizinischen Fakultät  
Nagasaki. Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)

(Eingegangen am 1. Mai 1937)

Die interessante Feststellung von K. Takao (1923), dass *d*-Milchsäure und *d*-Glukosamin in der Kulturflüssigkeit von Colibazillen gebildet wurde, lässt wohl daran erinnern, dass der Zerfall des Glukosaminmoleküls unter Eintritt von OH-Gruppe an Stelle der Aminogruppe in zwei C<sub>3</sub>-Ketten erfolgt, was in der Hauptsache bei der Abspaltung der Kohlenstoffkette des Hexosenmoleküls der Fall ist. Hier sei noch erwähnt, dass durch Bac. Prodigiosus sowie durch Bac. subtilis mehr oder weniger *l*-Milchsäure aus *d*-Glukosamin entsteht. Dazu kommt auch ein anderer Zerfallweg des Glukosamins in Betracht, indem die Dicarbonsäure mit 4 Kohlenstoffatomen nämlich Bernsteinsäure beim Glukosaminzerfall durch Mikroorganismen wie Colibazillen, oder Bac. subtilis isoliert werden konnte (1923).

Nun taucht eine neue Frage auf, wie die *d*-Glukosaminsäure durch Mikroorganismen sowie im Tierorganismus zerlegt wird, da die Säure als eine Polyoxy- $\alpha$ -aminosäure mit 6 Kohlenstoffatomen verschiedenen biologischen Zerfallwegen ausgesetzt werden kann. Aus der Erklärung des Zerfallwegs dieser Säure kann man auch andererseits vieles zur Kenntnis der biologischen Zerlegungsweise des Glukosamins beitragen.

Was das biologische Verhalten dieser Säure anbetrifft, weiss man bisher nur sehr wenig. Nach M. Bergmann (1934) konnten die aus *d*-Glukosaminsäure aufgebauten Dipeptide durch Dipeptidase (Darmerepsin) nicht hydrolysiert werden.

Daraufhin habe ich auf Veranlassung von Prof. Tomita das

Verhalten der *d*-Glukosaminsäure im Tierorganismus sowie in der Kulturflüssigkeit der Mikroorganismen studiert.

Nach den hier erzielten Ergebnissen muss der Zerfallweg der *d*-Glukosaminsäure in Coli-Kulturflüssigkeit ähnlich wie der des *d*-Glukosamins sein, da *d*-Milchsäure und Bernsteinsäure dabei isoliert werden. *Bac. paratyphi* bilden hauptsächlich die Bernsteinsäure.

Bei den Versuchen an Hunden und Kaninchen wurden neben *d*-Milchsäure auch Oxalsäure und Essigsäure aus dem Harn gewonnen.

Die Versuche, irgendeine Aminosäure aus der Kulturlösung oder aus dem Harn nach der Ester- oder  $\beta$ -Naphtalinsulfomethode zu isolieren, waren vergeblich.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Die in den Versuchen angewandte *d*-Glukosaminsäure wurde nach der Vorschrift von H. Pringsheim und G. Ruschmann (1915) durch Oxydation mit gelbem Quecksilberoxyd aus *d*-Glukosamin dargestellt, das aus Hummerschale durch Salzsäurehydrolyse gewonnen wurde.

##### 1. Versuch an Hunden.

10 g glukosaminsaures Natron wurden einem Hunde täglich mittels einer Schlundsonde eingegeben. Im ganzen wurden 120 g Na-Salz verabreicht. Der gesammelte Harn (ca. 10 Liter) wurde eingengt und nach Ansäuren mit  $\text{SO}_4\text{H}_2$  mit Wasserdampf destilliert. Aus dem Destillat wurde ein wenig Benzoesäure und Essigsäure als Ba-Salz (ca. 2 g) isoliert, welches aus heissem Wasser umkrystallisiert und analysiert wurde.

##### Analyse:

0,1128 g Substanz (getrocknet bei  $120^\circ$ ) ergaben 0,1034 g  $\text{BaSO}_4$ .

Ber. f.  $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  Ba = 53,1% Gef. Ba = 53,1%

Die nicht flüchtige, schwefelsaure Restlösung der Wasserdampfdestillation wurde mit Äther im Kumagawa-Suto-Apparat extrahiert. Beim Abhampfen des Äthers schieden sich stark sauer

reagierende Krystalle (0,8 g) aus, die weder Ninhydrin- noch Lassaignesche Probe zeigten und aus wenig Wasser umkrystallisiert, bei 100–103° schmolzen. Die Mischschmelzpunktprobe mit Oxalsäure zeigte keine Depression.

Die von der ausgeschiedenen Oxalsäure abfiltrierte Mutterlauge wurde getrocknet, mit wenig Wasser aufgenommen und mit  $\text{CO}_3\text{Pb}$  gekocht. Das Filtrat wurde mit  $\text{SH}_2$  zerlegt und wieder mit Äther extrahiert. Der abgedampfte Rückstand des Ätherextrakts wurde mit  $\text{ZnCO}_3$  in wenig Wasser gekocht. Beim Einengen des Filtrats erhielt man prismatische Nadeln (ca. 1 g), die, aus wenig Wasser umkrystallisiert, die Hopkinssche Reaktion zeigten und die polarisierte Ebene nach links drehten.

#### *Analyse:*

0,1630 g Substanz (getrocknet in Raumtemperatur) verloren bei 110° (3 Std.) 0,0216 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Ber. f.  $(\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_5)_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $\text{H}_2\text{O} = 12,89\%$

Gef.  $\text{H}_2\text{O} = 13,25\%$

0,0315 g Substanz (getrocknet bei 110°) ergaben 0,0106 g  $\text{ZnO}$

Ber. f.  $(\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_5)_2\text{Zn}$   $\text{Zn} = 26,85\%$  Gef.  $\text{Zn} = 27,24\%$

Die von der Ätherschicht getrennte Rückflüssigkeit wurde mit Baryt von  $\text{SO}_4\text{H}_2$  dann mit  $\text{CO}_2$  von Baryt befreit. Das Filtrat, in dem die Ninhydrinreaktion positiv ausfiel, wurde nach Fischerscher Estermethode auf die Aminosäureisolierung bearbeitet. Man erhielt aber keine krystallinische Substanz.

#### *2. Versuch an Kaninchen.*

8 Kaninchen erhielten täglich je 3 g glukosaminsaures Natron in 10%iger Lösung mittels Schlundsonde. Im Ganzen betrug es 120 g. Der gesammelte Harn (ca. 9 Liter) wurde der Wasserdampfdestillation unterworfen und weiter wie im Versuch 1 behandelt.

Aus dem Destillat hat man auch die Essigsäure als Ba-Salz (ca. 1,4 g) isoliert.

#### *Analyse:*

0,1538 g Substanz (getrocknet bei 110°) ergaben 0,1400 g  $\text{BaSO}_4$

Ber. f.  $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$   $\text{Ba} = 53,1\%$  Gef.  $\text{Ba} = 53,5\%$



Man hat aus dem Ätherextrakt der Destillationsrestlösung eine Spur Oxalsäurekrystalle, die bei 100–103° schmolzen, und dann d-michsaures Zink (1 g) gewonnen.

*Analyse:*

0,2475 g Substanz verloren bei 110° 0,0306 g Wasser  
 Ber. f.  $\text{Zn}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_5)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $\text{H}_2\text{O} = 12,89\%$  Gef.  $\text{H}_2\text{O} = 12,36\%$   
 0,0725 g wasserfreies Zinksalz ergaben 0,0246 g  $\text{ZnO}$   
 Ber. f.  $\text{Zn}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_5)_2$   $\text{Zn} = 26,85\%$  Gef.  $\text{Zn} = 27,23\%$

Die Isolierungsversuche von Aminosäuren aus der mit Äther nicht extrahierbaren Rückflüssigkeit blieben vergeblich ( $\beta$ -Naphthalinsulfomethode).

3. Versuch mit *Bac. paratyphi B* (*Salomonella schottmülleri*).

Die Nährlösung besteht aus folgender Zusammensetzung:

$\alpha$ -Glukosaminsäure	50 g
Pepton-Witte	5 g
$\text{NaCl}$	5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	1 g
$\text{MgSO}_4$	0,5 g
Wasser	1000 ccm

Die Kulturlösung wurde mit Soda schwach alkalisch gemacht, in 4 Kolben geteilt und im Dampftopf sterilisiert. Nach Einimpfung der Bakteriensuspension wurden die Kulturkolben 50 Tage bei 37° aufbewahrt. Darauf wurde der gesammelte Kolbeninhalt wieder durch Hitze (100°) sterilisiert und in der Weise wie beim Tierversuch behandelt. Die Resultate sind wie folgt:

- 1) Aus dem Destillat mit Wasserdampf konnte man keine eindeutige Substanz isolieren.
- 2) Aus dem Ätherextrakt der Destillationsrestlösung gelang es mir krystallinische Säure zu gewinnen (0,8 g), die bei 183° schmolz.

*Analyse:*

0,0503 g Substanz ergaben 0,0749 g  $\text{CO}_2$  und 0,0238 g  $\text{H}_2\text{O}$   
 Ber. f.  $(\text{CH}_2\text{--COOH})_2$   $\text{C} = 40,67\%$   $\text{H} = 5,12\%$

Gef. C=40,61% H=5,29%

0,1086 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation 18,0 ccm 0,1 n-NaOH

Ber. f.  $C_2H_4(COOH)_2$  18,4 ccm 0,1 n-NaOH

3) Die Mutterlauge der Bernsteinsäurekrystalle gab kein Zinksalz.

Die Versuche um Aminosäure zu isolieren waren auch vergeblich. Aus der Kulturlösung des Kontrollversuchs ohne Glukosaminsäure konnte man keine Bernsteinsäure gewinnen.

#### 4. Versuch mit *Bac. Coli*.

Die Kulturlösung enthielt folgende Bestandteile: 70 g *d*-Glukosaminsäure, 10 g Pepton-Witte, 10 g NaCl, 4 g  $KH_2PO_4$ , 1 g  $(NH_4)_2CO_3$ , 1 g  $MgSO_4$  und 2000 ccm Wasser. Die sterillisierte Kulturlösung, mit Soda schwach alkalisch gemacht, wurde nach Keimimpfung 60 Tage lang bei 37° erhalten. Die dunkelbraun gefärbte Kulturlösung wurde wie oben der Destillation und der Ätherextraktion unterworfen.

1) Das Destillat gab auch keine Krystalle.

2) Aus dem Ätherextrakt hat man bei 103° schmelzende Krystalle (0,4 g) erhalten.

#### Analyse:

0,1206 g Substanz verbrauchten zur Titration 19,8 ccm 0,1 n-NaOH

Ber. f.  $C_2H_4(COOH)_2$  20,4 ccm 0,1 n-NaOH

3) Aus der Mutterlauge wurde hier 0,8 g krystallinisches Zinksalz erhalten, das die positive Hopkins-Colesche Reaktion zeigte und die polarisierte Lichtebene nach links drehte.

#### Analyse:

0,1350 g Substanz (getrocknet in Raumtemperatur) verloren bei 110°  
0,0170 g an Gewicht.

Ber. f.  $Zn(C_3H_5O_3)_2 + 2H_2O$   $H_2O=12,89\%$  Gef.  $H_2O=12,59\%$

0,0265 g wasserfreies Salz ergaben 0,0069 g ZnO

Ber. f.  $Zn(C_3H_5O_3)_2$   $Zn=26,85\%$  Gef.  $Zn=27,16\%$

Die Kontrollversuche mit Nährlösung ohne *d*-Glukosaminsäure lieferten weder *d*-Milchsäure noch Bernsteinsäure.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Nach Verabreichung der *d*-Glukosaminsäure an Hunde sowie

an Kaninchen wurden aus dem Harn derselben Essigsäure, Oxalsäure und *d*-Milchsäure isoliert.

2. Aus *d*-Glukosaminsäure durch Einwirkung von *Bac. coli* wurden *d*-Milchsäure und Bernsteinsäure und durch *Paratyphusbazillen* Bernsteinsäure gebildet.

#### LITERATUR.

Bergmann, M. (1934): Z. f. physiol. Chem., **224**, 33.

Pringsheim, H. und Rusehmann, G. (1915): Ber. deuts. chem. Ges., **48**, 680.

Takao, K. (1923): Z. f. physiol. Chem., **131**, 307.

## LIPIDS ANALYSIS OF THE HUMAN BRAIN.

BY

MORIO YASUDA.

*(From the Biochemical Laboratory, Institute for Research in Physical Education, Ministry of Education, Tokio.)*

(Received for publication, May 4, 1937).

The present work has been undertaken to contribute to the psychochemistry by studying development of the lipids in brains suffering from various mental diseases. As early as 1834 Couerbe called attention that the contents of lipid phosphorus of the brains of idiots were lower and those of insane were higher than the normal brains. Since that time the lipids contents of the brains of mentally affected humans have been studied by several workers with little success in detecting definite changes (Koeh, 1922; Smith and Mair, 1911; Singer, 1928).

Seven samples of the brains of psychosis patients, i.e. 2 cases of dementia precox, 3 cases of dementia paralytica, one case each of catatonia and mania were analysed for the present investigation. However, as will be demonstrated later, changes in the lipids contents which are characteristic of a certain mental disease were not discovered. Then, the comparisons were made between the white and gray matters of these brains and it was found that the differences were very striking and almost constant. It is known that considerable differences are found between white and gray matters in their lipids and particularly in the phospholipid contents. However, with different methods of extracting lipids from the brain tissues and with different methods of determination, the data of the analysis did not agree between workers and seemed to need additional studies.

In this report the author is, therefore, intending to present the results of lipids analysis of gray and white matters of the brains with respect to the cholesterol and phospholipids contents and the iodine number of the latter.

## MATERIALS.

Materials were supplied from the Matsuzawa Hospital for Mental Diseases, Tokio, through the courtesy of Dr. M. Watanabe.

A part of the brain, occipital lobes, was brought to this laboratory as soon as possible after the autopsy, adherent membranes were quickly removed and the parenchyma of the brain tissue were cut into small pieces from which cortical gray and medullar white matters were separated with pincette and scissors. About 4 to 6 gm. of these tissues were taken onto a small watchglass covered with another one and weighed. About two thirds of them were taken out and put into a small mortar to be used for lipids analysis, and the rest was used for the determination of the water content.

## ANALYTICAL METHODS.

*Extraction of the Lipids*—Lipids were extracted with alcohol and ether after the description of Bloor (1929) with slight modifications: to fresh tissue in a mortar were added about 2 gm. of clean sand and ground with a pestle. The pasty mass was transferred to a 500 cc. Erlenmeyer flask with the aid of a narrow spatula, the adhering mass in the mortar was loosened by grinding after the addition of a small amount of water—about 1 cc. per each gm. of the tissue—and transferred into the Erlenmeyer flask. The mortar, pestle and spatula were repeatedly washed with small portions of redistilled alcohol which were similarly poured into the flask. The amount of alcohol was 200 cc. The flask was then connected with a condensor and heated on the steam bath for an hour, after which the alcohol extract was decanted and filtered into a 250 cc. volumetric flask. The residue in the Erlenmeyer flask was further extracted with 50 cc. of ether for about 10 minutes during which the flask was rotated gently to prevent explosive boiling. The ether extract was also filtered into the volumetric flask. A part of ether had evaporated during the extraction and filtration so that the flask and filter could be washed with another small portion of ether. The volume of the extract was finally made to 250 cc. with ether after cooling.



*Phospholipid Fraction*—10 to 20 cc. of alcohol-ether extracts made by above procedures were pipetted into a 100 cc. flask and evaporated to almost dryness on the steam bath. Gentle suction was applied at the end of evaporation. Then the lipids were extracted 3 times with 5 cc. portions of ether which were filtered through a glass filter and collected in a graduated centrifuge tube. The filtrate was concentrated to about 2 cc. added to 6 cc. i.e. 3 times as much acetone and 3 drops of saturated alcoholic solution of  $MgCl_2$  and well mixed with a small glass rod. The precipitate of phospholipids was next separated by filtering through a glass filter, and washed with acetone. Suction was continued for a while to remove acetone completely from the precipitate. The remaining precipitate of phospholipids in the centrifuge tube was also freed from acetone by evaporation. The precipitate in the filter and the centrifuge tube was lastly dissolved in chloroform, transferred into a 25 cc. volumetric flask and made to the volume with chloroform. 5 cc. of this chloroform solution were used as aliquots for the oxidative determination of phospholipids by Bloor (1929).

Another 5 cc. aliquots were used for the determination of the iodine number by the method of the author (1931-32). Boyd (1933) has commented on this method that, although it proved to be satisfactory for the determination of the iodine number of total fatty acids of blood plasma in the existence of cholesterol, the application of this method to whole phospholipid gave variable results so that the method ought to be applied to the fatty acids separated from phospholipids by saponification. But, the author believes that the above method is as well suited for the whole phospholipids as for fatty acids freed by the saponification, provided the solvents—acetone and ether, or petroleum ether—used for the isolation of phospholipids were completely removed before the halogenizing reagent was added, and aliquots phospholipids were sufficient enough.

*Cholesterol*—The author has lately reported on the determination of cholesterol by colorimetric procedures (1936), but the analysis of the brain lipids started before the new method was devised. The oxidative micro method (Yasuda, 1931) was

therefore adopted in this investigation. As aliquots 2-3 cc. of the alcohol-ether extracts of the white matter, and 5 cc. of those of gray matter were used.

*Water content*—Fresh tissues were dried at 105° for 3 hours, cooled in a decicator and weighed.

#### RESULTS AND COMMENTS.

The results of the analysis are given in Table I. The constancy of the lipids contents in gray and white matters, and the characteristically high values of them in the white matter are striking, although no appreciable change is observed between the brains as a whole.

The contents of the phospholipid fraction of the white matter of the brains were between 10.78 and 13.45 gm., the average being  $12.52 \pm 0.87$  gm. per 100 gm. of moist tissue while the average content in the gray matter was 4.35 gm. with the standard deviation of 0.50. The values calculated on 100 gm. of dry substance were  $39.33 \pm 1.47$  gm. for the white matter and  $25.22 \pm 2.76$  gm. for the other. The phospholipids content of the fresh white matter was, therefore, 3 times that of the gray matter, and the dried white matter contained 1.56 times as much phospholipids as the dried gray matter. Smith and Mair (1912-13) reported that the content of the total lipid phosphorus of white matter is 1.5 times as much as that of the gray matter, and according to Koch (1904) the corpus callosum (white matter) contains 8.7 per cent phospholipid while the cortex (gray matter) 3.9 per cent determined on moist tissue as cited by Sinclair (1934). These values agree partly with the present author's study, although a considerably large difference is found regarding the moist white matter.

The content of free cholesterol in the white matter was  $4.27 \pm 0.29$  or  $13.44 \pm 1.06$  gm. per 100 gm. of moist or dry tissue, and the corresponding values of the gray matter were  $1.08 \pm 0.11$  or  $6.25 \pm 0.45$  gm. showing that the moist white matter contains 4 times as much free cholesterol as the gray matter. According to Page and Menschick (1931) the cholesterol content of the brains increases gradually after birth and the increase continues in

TABLE I.  
Lipids analysis of the white and gray matters of the brains.

Diagnosis (Age, Sex)	Sample's No.	Water content	Phospholipid fraction			Cholesterol (free)		Ratio of Phospholipid to Cholesterol
			per 100 gm. moist tissue	per 100 gm. dry tissue	Iodine number	per 100 gm. moist tissue	per 100 gm. dry tissue	
		per cent	gm.	gm.		gm.	gm.	
Dementia precox (40 years, female)	M-1	67.02	12.82	38.90	64.0	3.96	12.02	3.2
Dementia precox (20 years, male)	C-1	81.70	4.48	24.50	91.2	1.15	6.26	3.9
Dementia paralytica (44 years, male)	M-2	69.55	11.25	36.94	68.5	4.28	14.01	2.6
Dementia paralytica (53 years, male)	C-2	83.78	4.36	26.88	102.0	1.09	6.68	4.0
Dementia paralytica (53 years, female)	M-3	72.64	10.78	39.45	69.0	3.95	14.41	2.7
Catatonia (28 years, female)	C-3	82.48	3.66	20.89	90.0	0.95	5.38	3.9
Mania (42 years, female)	M-4	66.62	13.28	39.81	64.5	4.55	13.68	2.9
	C-4	81.88	4.45	24.55	91.4	1.12	6.17	4.0
	M-5	66.65	13.45	40.33	62.0	4.00	12.00	3.4
	C-5	82.62	5.04	29.00	85.2	1.18	6.83	4.3
	M-6	68.16	13.28	41.87	68.6	4.76	14.95	2.8
	C-6	85.25	3.64	24.68	101.0	0.88	5.94	4.2
	M-7	66.39	12.78	38.02	68.0	4.38	13.00	2.9
	C-7	81.39	4.85	26.06	87.5	1.21	6.47	4.0
Average of M (1-7) . . . . .			12.52±0.87	39.33±1.47	66.4±2.6	4.27±0.29	13.44±1.06	2.9±0.26
C (1-7) . . . . .			4.35±0.50	25.22±2.76	92.6±6.7	1.08±0.11	6.25±0.45	4.0±0.15

\* M . . . . Medullar part (white matter) of occipital lobes of the brain.

C . . . . Cortical part (gray matter) of occipital lobes of the brain.

childhood. Adult brains contains 1.9 per cent of cholesterol. Since they worked on the whole brain tissue, their results may not be compared with the figures in Table I of this report.

The Total cholesterol was not determined as it did not seem primarily important to work on the total cholesterol of a tissue like the brain in which most cholesterol is in the free state.

The difference between the iodine numbers of the phospholipid fractions of gray and white matters was remarkable. No reference was available as to the iodine number of the phospholipid of separate parts of the brain. It seems highly probable that the contamination of cerebroside in the phospholipid fraction of the white matter might be attributed to its low iodine number, since cerebroside are regarded to be solely contained in the white matter of the nervous system and the complete removal of them from the phospholipid fraction by the procedures adopted by the author may not be expected. Rudy and Page (1930) found that the iodine number of crude cephalin isolated from the human brain was 76.8 and that of purified cephalin which contained no cerebroside was 97.9, a figure very near the iodine number of the phospholipid in the gray matter ( $92.6 \pm 6.7$ ). However, the iodine numbers of stearyl-linoyl cephalin and stearyl-linoyl lecithin are calculated to be 68 and 63 which agree with the iodine numbers of the phospholipid fraction of white matter ( $66.4 \pm 2.6$ ), and those of stearyl-linolenyl cephalin and stearyl-linolenyl lecithin are 102 and 95 respectively which are in fair agreement with the ones of the gray matter phospholipids as mentioned above. Accordingly, it seems likewise probable that the marked difference in the phospholipid iodine numbers of the white and gray matters is based on the difference in the nature of fatty acids composing the phospholipids. The question would need further elucidation.

The high water content and the high ratio of phospholipid to free cholesterol in the gray matter compared with the white matter were also noticeable. The significance of the ratio of phospholipid to cholesterol has been often discussed as summarised by Sinclair (1934), and it may be of interest that the ratio seems to be related to the water balance of the cell since the water contents of the gray

and white matters were apparently proportional to this ratio. According to Mayer and Schaeffer (1914) the water content of the tissues is inversely proportional to the Phospholipid: cholesterol ratio, while Degwitz (1931) maintained the opposite. The results in Table I are in favor of the Degwitz's idea.

#### SUMMARY.

The lipids in the brains of various psychosis patients (7 cases in all) were analysed. Definite changes which characterize mental diseases were not found, but the lipids in the gray and white matters differed as may be summarised as follows:

1. The contents of phospholipid fraction and cholesterol in the gray and white matters are fairly constant and the values are specific to each of them.

2. The content of the phospholipid fraction of the fresh white matter is about 3 times that of gray matter, and the content of free cholesterol of the former is about 4 times as much as the latter. Since the water content of the white matter is much less than the other, the difference in the lipids contents of dried gray and white matters is not as large as observed on fresh moist tissues although it is still significant enough.

3. A marked difference is found between the iodine numbers of the phospholipid fractions of gray and white matters. It was not decided whether this difference is attributable to the difference in the grade of desaturation of fatty acids in the phospholipid molecule or to contaminated cerebrosides.

4. The ratio of phospholipid to cholesterol is considerably higher in the gray matter than in the white matter. The high water content of the gray matter might be related to the high ratio of phospholipid to cholesterol.

The author is deeply indebted to Professor S. Kakiuchi of Tokio Imperial University for helpful criticisms during this work.



## BIBLIOGRAPHY.

- Bloor, W. R. (1929): *J. Biol. Chem.*, **82**, 273.  
Boyd, E. M. (1933): *J. Biol. Chem.*, **101**, 323.  
Couerbe, J. P. (1834): *Ann. Chim. Phys.*, **56**, 160.  
Degwitz, R. (1931): *Ergeb. Physiol.*, **32**, 821.  
Koch, W. (1904): *Am. J. Physiol.*, **11**, 303.  
Koch, M. L. (1922): *Arch. Neurol. Psychol.*, **7**, 488.  
Mayer, A. and Schaeffer, G. (1914): *J. Physiol. Path. Gén.*, **16**, 1, 23.  
Page, I. H. and Menschick, W. (1931): *Biochem. Z.*, **231**, 446.  
Rudy, H. and Page, I. H. (1930): *Z. Physiol. Chem.*, **193**, 251.  
Sinclair, R. G. (1934): *Physiol. Rev.*, **14**, 351.  
Singer, K. (1928): *Biochem. Z.*, **198**, 340.  
Smith, J. L. and Mair, W. (1911): *J. Path. Bact.*, **16**, 131.  
Smith, J. L. and Mair, W. (1912-13): *J. Path. Bact.*, **17**, 123.  
Yasuda, M. (1931): *J. Biol. Chem.*, **92**, 303.  
Yasuda, M. (1931-32): *J. Biol. Chem.*, **94**, 401.  
Yasuda, M. (1936): *J. Biochem.*, **24**, 429.

# ÜBER DIE EINFLÜSSE DES SCHWANGERENHARNS, DES EXTRAKTES DER PLAZENTA, DES PROLANS, DES SERUMS DES SCHWANGEREN KANINCHENS UND DER EMULSION DER HYPOPHYSE AUF DIE OXYDASEREAKTION DES OVARIUMS, DES UTERUS UND EINIGER ANDERER ORGANE.

VON

KAN-ITI KIOHARA UND SHOZŌ IZAWA.

(Aus dem physiologischen Institut der medizinischen Universität zu Nagasaki.  
Direktor: Prof. Dr. D. O g a t a.)

(Eingegangen am 6. Mai 1937.)

Der für die Frühdiagnose der Schwangerschaft am häufigsten angewandte Harn enthält viele Substanzen bzw. Hormone, welche in verschiedenen Organen gebildet werden. Das Problem, welche Substanz im Schwangerenharn bei der Frühdiagnose der Schwangerschaft die grösste Rolle spielt, darf nicht vernachlässigt werden. Darüber sind zwar zahlreiche Forschungen unternommen worden, doch ist bisher sogar der Ort, in dem die Substanz gebildet wird, noch nicht festgestellt. Untersuchungen dieses Gebietes bezüglich des Stoffwechsels der weiblichen Geschlechtsorgane selbst gibt es wenig. Verfasser haben also die Oxydasereaktion des Ovariums, des Uterus und einiger anderer Organe erforscht. Die Resultate sind wie folgt.

## VERSUCHSMATERIAL UND METHODIK.

Als Versuchstiere haben Verfasser etwa 250–300 g wiegende gesunde, nicht schwangere, weibliche Meerschweinchen gewählt. Die Tiere wurden durch Kopfschlag getötet. Nach etwa 30 minutiger Härtung in 6%iger Formollösung wurden Gefrierschnitte ( $30\mu$ ) der Organe hergestellt, die in einem Gemisch von  $\alpha$ -Naphthol- und  $p$ -Phenylendiaminlösung nach Gierke 5–10 Minuten lang gefärbt und nach Einschluss in Glyzerin mikroskopisch untersucht

wurden. Durch kurzdauernde Härtung in Formollösung ist fast keine nennenswerte Zerstörung der Oxydasegranula zu beobachten.

# RESULTATE.

## I. Normale Tiere.

### 1) Ovarium.

a) *Follikel.* Die Zellen der Primärfollikel und der leichtgradig entwickelten Follikel weisen fast keine Oxydasegranula auf. Mitunter aber können ganz geringe blaue Granula beobachtet werden.

In den Epithelzellen und den Zellen der Tunica interna der reifen Follikel sind Oxydasegranula häufig zu beobachten, aber nicht konstant (Tabelle I). Obgleich wenige Follikel ziemlich stark positive Oxydasereaktion zeigen, sind viele Follikel ganz spärlich granuliert. In ganz seltenen Fällen kann man Gruppierungen von zahlreichen Granula beobachten, welche den im Uterusgewebe häufig befindlichen Wanderzellen äusserst ähnlich sind.

TABELLE I. Normal.

Versuchsnummer	Follikel	Uterus	
		Schleimhaut	Drüse
1	—	/	/
3	+	/	/
4	—	/	/
6	—	+	+
8	+	+	—
10	+	—	+
12	—	—	+
13	—	+	+
16	—	+	+
43	—	—	—
44	—	—	—

Diese schwankenden Befunde dürften auf die Wirkungen des oestrischen Zyklus zurückzuführen sein, welche von Tsuchiya näher untersucht worden sind.

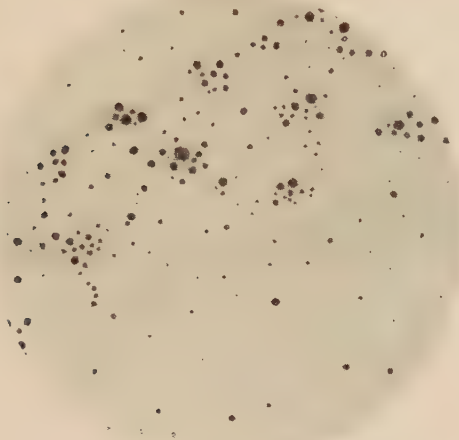


Fig. 1.  
Follikel des normalen Meerschweinchens.

b) *Luteinzellen*. In den Luteinzellen zeigt sich deutlich blaue Granulierung, worüber Matsuyama, Tsuchiya u.a. ähnliche Resultate veröffentlicht haben.

c) *Stroma*. Die Stromazellen weisen mitunter hie und da zerstreute Granulierung auf, doch ist sie nie bemerkenswert.

d) *Interstitielle Drüsen*. Diese Drüsenzellen zeigen immer positive Oxydasereaktion.

## 2) *Uterus*.

In der Muskelschicht können feine Oxydasegranula beobachtet werden, diese aber sind an Zahl ganz gering.

Die Epithelzellen der Schleimhaut und der Uterusdrüse enthalten auch häufig Oxydasegranula, mitunter reichlich aber im allgemeinen spärlich (Tabelle I). Ausser der Oxydasegranula des Uterusgewebes selbst können zuweilen Wanderzellen mit auffallend stark positiver Oxydasereaktion beobachtet werden, welche nach Tsuchiya mit dem Oestruszyklus in innigem Zusammenhang stehen.

## 3) *Hypophyse*.

In den Drüsenzellen des Vorderlappens befinden sich sehr

dicht zerstreute feine Oxydasegranula, welche mit gröberen Granula vermischt sind.

4) *Schilddrüse.*

Die Follikelepithelien enthalten die Oxydasegranula reichlich, aber die kolloide Substanz im Lumen der Follikel zeigt nur eine diffus leicht bläuliche Verfärbung.

5) *Leber.*

Die Leberzellen besitzen ziemlich reichliche Oxydasegranula.

6) *Niere.*

Abgesehen von den Malpighischen Körperchen und Bowman'schen Kapseln zeigen die Harnkanälchen deutlich feine Oxydasegranula.

## II. *Wirkung des Schwangerenharns.*

Der aus gesunden schwangeren Frauen, welche sich im 6.-8. Monat der Schwangerschaft befanden, bekommene Morgenharn wurde 7-8 ccm pro kg dem Meerschweinchen intravenös injiziert.

1) *Ovarium.*

a) *Follikel.* 15-22 Stunden nach der Injektion vermehrt sich die Zahl der Primärfollikel, welche feine Oxydasegranula aufweisen. Doch ist der Gehalt an Granula niemals deutlich. Sowohl 2-3 Stunden als auch 44 Stunden nach der Injektion finden sich oxydasepositive Primärfollikel sehr selten.

In den reifen Follikeln 15-22 Stunden nach der Injektion sind ausnahmslos beträchtlich dicht verteilte Oxydasegranula zu beobachten, besonders sind sie am deutlichsten in der Tunica interna und den Follikelepithelien. Grössere Follikel zeigen deutlichere Oxydasereaktion als kleinere. Diese Vermehrung der Oxydasegranula findet schon 5 Stunden nach der Injektion statt, aber nicht so deutlich. Nach 2 Tagen vermindert sich der Gehalt an Granula, nach 3-4 Tagen weisen die meisten Follikel fast gleiche Bilder wie die der normalen Tiere auf (Tabelle II).

Bemerkenswert ist, dass in den meisten reifen Follikeln, welche stark positive Oxydasereaktion zeigen, viele Gruppierungen von zahlreichen blauen Granula zu beobachten sind, welche in



TABELLE II.  
Injektion von Schwangerenharn.

Versuchs- nummer	Stunden nach der Injektion	Follikel	Uterus	
			Schleimhaut	Drüse
31	5	++	+	+
32	5	+++	+	+
39	6	++	++	++
2	15	++	/	/
14	15	++	/	/
15	15	++	/	/
9	16	++	/	/
7	17	++	/	/
23	17	++	++	++
30	18	++	++	++
11	20	++	/	/
24	22	++	++	++
33	44	+	++	++
34	44	+	++	++
25	48	+	+	+
26	48	+	++	++
27	72	—	/	/
28	72	—	/	++
38	72	+	/	++
29	96	—	/	/

reifen, oxydasepositiven Follikeln der normalen Tiere auch bemerkt werden können und den im Uterusgewebe nach der Schwangerenharninjektion reichlich befindlichen Wanderzellen äusserst ähnlich sind. Diese Gruppierungen von Granula kommen meist in der Tunica interna und der Follikelepithelschicht zum Vorschein, ferner auch geringer im interstitiellen Gewebe. Nicht nur nach der Injektion von Schwangerenharn, sondern auch nach der von Prolan, Extrakt der Plazenta u.s.w. werden dieselben Gruppierungen von Granula beobachtet.

b) *Luteinzellen, Stroma und interstitielle Drüsen.* Der Gehalt an Oxydasegranula dieser Zellen verhält sich unverändert.

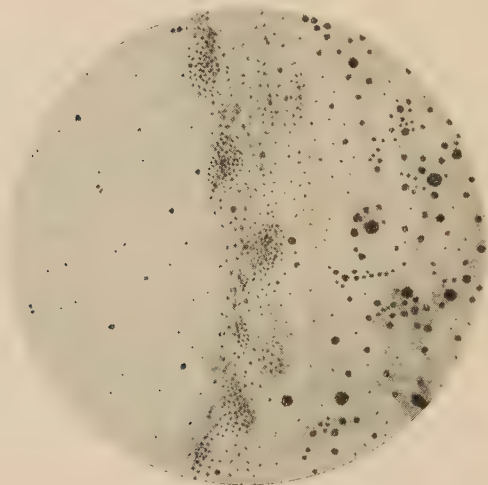


Fig. 2.

Follikel 15 Stunden nach der Schwangerenharninjektion.

## 2) *Uterus.*

Während in den Uterusmuskelzellen eine Vermehrung des Oxydasegehaltes nicht zu bemerken ist, zeigen die Epithelzellen der Schleimhaut und der Uterusdrüse in Mehrzahl, aber nicht immer deutlich vermehrten Gehalt an Granula (Tabelle II). Ausser der eigentlichen Uterusgewebe finden sich oft viele Wanderzellen, welche zahlreiche Oxydasegranula enthalten, weswegen das Uterusgewebe im ganzen reichlich an Granula aussieht. Das Auftreten dieser Wanderzellen ist deutlich 15–22 Stunden nach der Injektion.

## 3) *Hypophyse, Schilddrüse, Leber und Niere.*

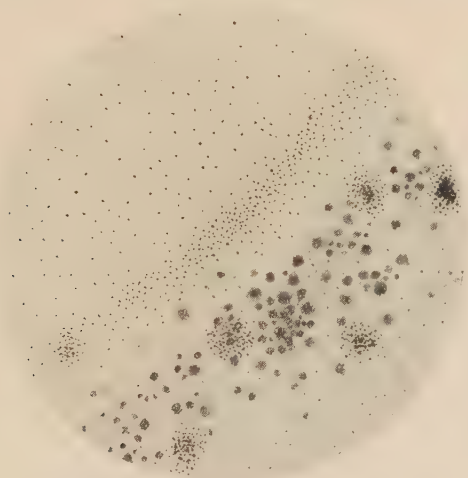
Die Zellen dieser Organe zeigen fast keine Veränderung des Gehaltes an Oxydasegranula.

## III. *Wirkung des Extraktes der Plazenta.*

Nach der Zerschneidung der Menschenplazenta in kleine Stückchen, wurde sie in 4 facher Menge von Ringerlösung in der Eiskammer 24 Stunden lang extrahiert, und 7–8 cem pro kg intravenös injiziert.

TABELLE III.  
Injektion von Plazentaextrakt.

Versuchs- nummer	Stunden nach der Injektion	Follikel	Uterus	
			Schleimhaut	Drüse
40	16	++	++	++
41	16	+	++	++
42	16	++	++	++
22	16,5	+	/	++
18	18	++	+	++
19	24	++	—	++

Fig. 3.  
Follikel 17 Stunden nach der Prolaninjektion.1) *Ovarium.*

a) *Follikel.* Nach 16–24 Stunden verhalten sich die Primärfollikel in seltenen Fällen oxydasepositiv, aber niemals deutlich.

Die reifen Follikel zeigen eine deutliche Vermehrung des Oxydasegehaltes, und viele Gruppierungen von Granula treten auch auf (Tabelle III). Ferner ist die Vermehrung des Oxydasegehaltes in den Zellen der Tunica interna und der Follikelepithel deutlich, auffallender in den grösseren als in den kleineren.

b) *Luteinzellen, Stroma und interstitielle Drüsen.* Der Gehalt an Oxydasegranula dieser Zellen zeigt fast keine Veränderung.

2) *Uterus.*

Der Oxydasegehalt des Uterusmuskels verhält sich unverändert, aber in den Zellen des Schleimhaut- und Drüsenepithels kann leichte Verstärkung der Oxydasereaktion bemerkt werden (Tabelle III). Wie nach der Schwangerenharninjektion, treten auch viele Wanderzellen hier und da im Uterusgewebe auf.

3) *Hypophyse, Schilddrüse, Leber und Niere.*

In den Zellen dieser Organe wurde keine merkliche Veränderung des Oxydasegehaltes bemerkt.

#### IV. *Wirkung des Prolans.*

Das Prolan (Beyer) wurde 100 Ratteneinheiten pro kg intravenös injiziert und nach etwa 17 Stunden wurde die Oxydasereaktion untersucht.

1) *Ovarium.*

a) *Follikel.* Die Follikel zeigen die gleichen Bilder wie nach der Schwangerenharn- oder Plazentaextraktinjektion, nämlich während die Primärfollikel nur eine leicht verstärkte Oxydasereaktion aufweisen, ist die Verstärkung in den reifen Follikeln deutlich (Tabelle IV), die durch viele Gruppierungen von Oxydasegranula ausgezeichnet ist.

b) *Luteinzellen, Stroma und interstitielle Drüsen.* In diesen Zellen kommt keine Verstärkung zum Vorschein.

2) *Uterus.*

Der Uterusmuskel und die Epithelzellen der Schleimhaut und Uterusdrüsen verhalten sich ebenso wie nach der Schwangerenharninjektion (Tabelle IV), wobei auch zahlreiche Wanderzellen auftreten.

3) *Hypophyse, Schilddrüse, Leber und Niere.*

Die normal positive Oxydasereaktion der Zellen dieser Organe bleibt ohne merkliche Veränderung.

TABELLE IV.  
Injektion von Prolan.

Versuchs- nummer	Stunden nach der Injektion	Follikel	Uterus	
			Schleimhaut	Drüse
49	17	++	++	++
50	17	++	++	++

V. *Wirkung des Serums des schwangeren Kaninchens.*

Die Injektion von 5 ccm des Serums des schwangeren Kaninchens pro kg kann eine merkliche Veränderung der Oxydasereak-

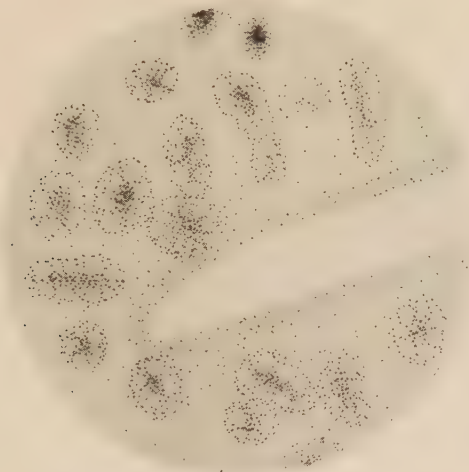


Fig. 4.

Uterus 15 Stunden nach der Schwangerenharninjektion.

tion des Ovariums, des Uterus u.a. nicht herbeiführen; nach 15–20 Stunden verhalten sich die Follikel des Ovariums, das Uterusgewebe u.a. fast gleich wie normal.

Aber 15–17 Stunden nach der Injektion von 10 ccm des Serums pro kg wurde merkliche Verstärkung der Oxydasereaktion einiger Gewebe bemerkt; die reifen Follikel weisen deutlich verstärkte Oxydasereaktion mit Gruppierungen von Oxydasegranula auf, und



der Uterus kennzeichnet sich durch das vermehrte Auftreten von Wanderzellen (Tabelle V).

TABELLE V.  
Injektion von Blutserum schwangeren Kaninchens.

Versuchs- nummer	Stunden nach der Injektion	Follikel	Uterus	
			Schleimhaut	Drüse
45	15	++	/	##
46	15	++	/	##
47	15	++	/	++
48	17	##	++	++

#### VI. Wirkung der Hypophysenemulsion.

1 Teil der Hypophyse des Kaninchens wurde in 4 Teilen Ringerlösung fein zerrieben und 16 Stunden nach der intravenösen Injektion von 10 ccm dieser Emulsion pro kg wurde der Oxydasegehalt mikroskopiert.

##### 1) Ovarium.

a) *Follikel*. In den reifen Follikeln wurde eine merklich verstärkte positive Oxydasereaktion mit Gruppierungen von blauen Granula bemerkt, aber keineswegs auffallend in den Primärfollikeln.

b) *Luteinzellen, Stroma und interstitielle Drüsen*. Diese Zellen zeigen kaum veränderte Oxydasereaktion.

##### 2) Uterus.

Die Oxydasereaktion der Epithelzellen der Schleimhaut und Uterusdrüse verstärkt sich leichtgradig (Tabelle VI). Ausser

TABELLE VI.  
Injektion von Hypophysenemulsion.

Versuchs- nummer	Stunden nach der Injektion	Follikel	Uterus	
			Schleimhaut	Drüse
35	16	##	/	++
36	16	++	/	##
37	16	++	++	++

dieser Verstärkung ist die Reaktion ausgezeichnet durch Wanderzellen wie nach Schwangerenharn- oder Prolaninjektion.

3) *Hypophyse, Schilddrüse, Leber und Niere.*

Diese Zellen weisen keine veränderte Oxydasereaktion auf.

*VII. Wirkung des Harns der nicht schwangeren Frau.*

Der Harn der nicht schwangeren Frau übt keinen Einfluss auf die Oxydasereaktion dieser Organe aus.

Über den Gehalt an Oxydasegranula der normalen, weiblichen Geschlechtsorgane sind nicht wenige Untersuchungen veröffentlicht worden (Ehrlich, Graeff, Ikeda, Katsunuma, Matsuyama, Tsuchiya u.a.), doch steckt die Forschung der Wirkung der Hormone besonders der Geschlechtshormone auf die Oxydasereaktion noch in den Anfängen.

Dass im allgemeinen der Gehalt an Indophenoloxydasegranula in innigem Zusammenhang mit der Funktion der Organe steht, ist beinahe sicher festgestellt worden. Nach den oben erwähnten Ergebnissen von Verfassern wirken der Schwangerenharn, das Plazentaextrakt, das Prolan, das Serum des schwangeren Kaninchens und die Hypophysenemulsion alle verstärkend auf die Oxydasereaktion der Follikel des Ovariums, der Schleimhaut- und Drüsenepithel des Uterus. Besonders zeigen die Follikel eine auffallende Verstärkung der Oxydasereaktion mit Gruppierungen von blauen Granula, ferner ist das Auftreten von Wanderzellen im Uterusgewebe hervorzuheben. Aber die anderen Organe, nämlich die Leber, die Niere und auch die mit den Geschlechtsorganen in innigem Zusammenhang stehenden Schilddrüse und Hypophyse weisen keine merkbare Veränderung der Oxydasereaktion auf; daraus könnte die Wirkung dieser Hormone als eine spezifische, elektiv auf das Ovarium und den Uterus ausgeübte angesehen werden.

Bei den Wirkungen des Hypophysen- und Plazentahormons auf die Oxydasereaktion des Ovariums und Uterus konnten leider keine charakteristischen Unterschiede zwischen beiden bemerkt werden, was vielmehr zeigen muss, dass das sogenannte Hypo-

physenvorderlappenhormon im Schwangerenharn und Schwangerenserum die beiden Hormone enthält, welche in der Hypophyse und der Plazenta einzeln gebildet werden und die beide einander äusserst ähnliche Wirkungen ausüben.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Zellen der Follikel des normalen Meerschweinchens sind oxydasepositiv, aber inkonstant und im allgemeinen spärlich granuliert. Die Luteinzellen und die interstitiellen Drüsen weisen deutlich positive Oxydasereaktion, die Stromazellen leicht positive auf.

2. Die Epithelzellen der Uterusschleimhaut und der Uterusdrüse des normalen Meerschweinchens besitzen auch Oxydasegranula. Manchmal treten Wanderzellen, welche deutliche Oxydasereaktion aufweisen, im Uterusgewebe hie und da auf.

3. Die intravenöse Injektion von Schwangerenharn, Extrakt der Plazenta, Prolan, Serum des schwangeren Kaninchens und Hypophysenemulsion führt eine auffallende Verstärkung der Oxydasereaktion der Follikel mit Gruppierungen von Oxydasegranula herbei, während der Oxydasegehalt der Hypophyse, Schilddrüse, Leber und Niere beinahe unverändert bleibt.

Diese Hormone wirken ferner verstärkend auf die Oxydasereaktion der Epithelzellen der Uterusschleimhaut und der Uterusdrüse, dabei ist vermehrtes Auftreten von Wanderzellen, welche starke Oxydasereaktion zeigen, bemerkenswert.

4. Die auf die Oxydasereaktion verstärkend wirkenden Einflüsse dieser Hormone weisen untereinander keine charakteristischen Unterschiede auf.

#### LITERATUR.

Ehrlich: Zit. nach Katsunuma.

Graeff: Zit. nach Katsunuma.

Ikeda (1914): Mitt. der med. Fakultät der Kaiserl. Universität zu Tokio, 13, 161.

Katsunuma (1924): Intrazelluläre Oxydation und Indophenolblausynthese. Jena.

Matsuyama: Zit. nach Katsunuma.

Tsuchiya (1924): Kumamoto Igakkai Zassi, 5, 687 u. 707.

## COLORIMETRIC ANALYSIS OF AMINOSUGARS IN PROTEIN HYDROLYSATES ON THE PRINCIPLE OF ELSON AND MORGAN.

BY

HAJIME MASAMUNE AND YOSHIO NAGAZUMI.

*(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University,  
Sapporo.)*

(Received for publication, May 11, 1937.)

The Elson and Morgan method is not, as such, applicable to determining aminosugars of glycoproteins, because amino acids and nonaminosugars present in protein hydrolysates affect the process of acetylation and subsequent condensation, the former moving the alkalinity of the reaction mixture. Therefore, we raised, on one hand, the concentration of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in the acetyl-acetone solution with simultaneous addition of  $\text{NaCl}$  for the purpose of keeping the alkalinity of the solution within a narrow appropriate range and, hydrolysed proteins on the other, by means of strong hydrochloric acid so that they were totally decomposed.

In the meantime, while these procedures were devised and checked on a few glycoproteins, of which informations have been furnished recently in this journal (Onoe, Ozaki, and Masamune and Hoshino) two accounts dealing with the same subject were published, one by Boyer and Fürth (1935) and the other by Nilsson (1936). By the former authors the "Nomalverfahren" was elaborated for pure glucosamine solution, after scrupulous examination of conditioning factors in the method of Elson and Morgan. Even this process, however, was criticized by them as insufficient to induce glucosamine to full coloration in protein hydrolysates. On the contrary, from what the latter author

---

\* XXVI report of "Biochemical Studies on Carbohydrates" (H. Masamune). A summarised report of this paper was presented at the 12th annual meeting of the Biochemical Society of Japan, Sept. 1936.

pronounced, the original procedures can be made by slight alterations into an accurate micro-method, which is proceeded on much less amounts of proteins. He made use of a photometer. We tried to carry out the analysis by means of a simple colorimeter.

## Experimental.

### ANALYTICAL PROCEDURES.

A requisite amount of a protein (glycoprotein) is weighed, taken up in 10 cc. of 5.5 *n* HCl and heated for 5 hours under reflux in a boiling bath. The hydrolysate is neutralized with anhydrous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-powder, transferred quantitatively into a measuring flask of 25 cc. or of 50 cc. capacity, and then filled up to the mark with water, after addition of 5 cc. (or 10 cc.) of 20% lead acetate solution. The filtrate is subsequently treated with H<sub>2</sub>S, excess of the later expelled, and acetic acid remaining is extracted off with ether for 2 hours in a continuous extractor. The solution is now ready for the colorimetric estimation, which is proceeded as below:

#### a. REAGENTS.

1. Acetylacetone solution (Reagent I): 0.5 cc. of acetylacetone (purified by distillation) is added to 75 cc. of 1 *n* Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution involving a calculated amount\* of NaCl which is so varied that the acetylation-condensation mixture contains 0.585 gm (1/100 gm mol) of this salt in total. It should be prepared before each use.

2. *p*-Dimethylaminobenzaldehyde solution (Reagent II): It is made according to the original direction, namely 0.8 g of recrystallized *p*-dimethylaminobenzaldehyde is dissolved in a mixture made of 30 cc. of fuming HCl (sp. gr. 1.19) and 30 cc. of absolute alcohol.

3. Artificial standard for colour comparison: 200 cc. of the

---

\* The calculation is made under the assumption that the lead acetate added casts out the equivalent amount of hydrochlorid acid as lead chloride from the hydrolysis mixture.



borate buffer solution (Clark and Lubs) is mixed with 3 cc. of the phenol red stock solution (Clark and Lubs).

#### b. TECHNIQUE OF COLORIMETRIC ESTIMATION.

A measured quantity (1-4 cc.) of the above solution, which contains 3 mg or less of glucosamine or of chondrosamine as the chlorhydrate, is pipetted into a test tube (19 cm×2.3 cm) with a graduated constriction at the height of 10 cc. At first, water up to 4 cc., afterwards 3 cc. of reagent I are added and, after the mixture is shaken together, the tube is set up in a metal condenser\* and placed in a boiling bath for 15 minutes. At the end of this time, the solution is cooled quickly under the tap water and mixed with 1 cc. of absolute alcohol. Then 1 cc. of reagent II and absolute alcohol up to the mark are flowed down the side of the tube quietly, so that three layers are formed and thereafter all are shaken together whereby the volume is reduced. The tube is, subsequently, placed in a bath at 20°C for 30 minutes, followed by filling up the reduced volume again with absolute alcohol and mixing thoroughly. Colour depth at this stage is finally compared against the artificial standard set at 20 mm.

Calculation is made from the reading by the following formulas:

$$\text{mg glucosamine hydrochloride} = \frac{17.262}{\text{reading in mm}} - 0.76$$

$$\text{mg chondrosamine hydrochloride} = \frac{19.209}{\text{reading in mm}} - 0.815$$

#### NOTES.

1. The degrees of colouration by glucosamine and by chondrosamine are of straight line functions within the range from 1.0 mg to 3.0 mg.

---

\* A metal can (height 10.5 cm, diameter 18.5 cm) with legs (height 7.5 cm) standing on a frame of a round net. The can is provided with 14 borings which are fitted tight to test tubes and with an inlet and an outlet of running water. The tubes are stood on the net through the borings so that their upper parts are cooled, while the lower parts are heated.

TABLE I.

Amount of aminosugar mg.	Reading of colorimeter mm.	Reverses of readings
Glucosamine hydrochloride		
0.3	30.70	0.033
0.5	17.76	0.056
0.8	11.62	0.087
1.0	9.76	0.103
1.3	8.32	0.120
1.5	7.44	0.134
1.8	6.66	0.150
2.0	6.20	0.161
2.3	5.70	0.176
2.5	5.30	0.189
3.0	4.60	0.218
3.5	4.10	0.244
4.0	3.80	0.263
Chondrosamine hydrochloride		
0.3	45.33	0.022
0.5	20.35	0.049
0.8	12.06	0.083
1.0	10.62	0.094
1.5	8.16	0.123
2.0	6.70	0.149
2.5	5.64	0.178
3.0	5.00	0.200
3.5	4.48	0.223
4.0	4.30	0.233

When the amount of an aminosugar in 4 cc. of the solution to be analysed does not reach 1 mg., estimation can be exerted after addition of its definite quantity.

2. The colour depth depends upon the time for which the final reaction mixture is placed in the thermostat as is illustrated in table II. It is seen that, after 30 minutes, decoloration proceeds

very slowly.

TABLE II.

Time of placing in thermostat at 20°C. min.	Reading of colorimeter (analysed: 1 mg glucos- amine hydrochloride) mm.	Reading of colorimeter (analysed: 1 mg chon- drosamine hydrochloride) mm.
0	6.0	8.12
5	6.66	
10	7.22	9.78
20	8.80	10.12
30	9.76	10.62
40	9.76	11.08
50	9.78	11.28
60	9.78	11.40

3. Effects of non-aminosugars and of aminoacids: In the original Elson and Morgan method, colour development is affected not only by aminoacids but also by traces of simple acids (Table III). The influence is avoided almost completely by changing the concentration of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in the acetylacetone solution and simultaneous addition of  $\text{NaCl}$ . The relationships between the colour development and the quantity of these salts are embodied in the appended table (IV).

Table V indicates in what degrees glucosamine and chondrosamine are recovered by our procedures in presence of single amino

TABLE III.

Analysed: 2 mg of glucosamine hydrochloride.

Acid added	Coloration		
	Reading of colorimeter mm.	Glucosamine hydrochloride calculated. mg.	Recovery %
3 cc of 0.02 n $\text{CH}_3\text{COOH}$	11.6	0.92	46
	11.5	0.93	46.5
3 cc of 0.02 n $\text{HCl}$ .	11.6	0.92	46
	11.6	0.92	46

acids.

As is demonstrated, glycin, when present in a large quantity, promotes the coloration of aminosugars. The analysis of proteins which involve much quantities of this aminoacid appears accordingly not to give correct values, while, in fact, other aminoacids liberated simultaneously counteract it, as regards buffering action and so its effect can be practically neglected. Examples on casein and gelatin hydrolysates are seen below.

Interfering effects of nonamino-sugars are eliminated by 5 hours heating with 5.5 n. hydrochloric acid as is seen in table VI.

TABLE IV.

1 cc of 2% watery acetylacetone solution was used for each analysis. Total volume of the acetylation-condensation mixture: 7 cc. Colour comparison was made after 30 minutes in the thermostat at 20°C. Glucosamine hydrochloride taken for analysis: 2 mg.

Conc. of $\text{Na}_2\text{CO}_3$ in the mixture n.	Conc. of NaCl in the mixture n.	Colorimetric reading mm.
$\frac{0.5}{7}$	0	10.26
$\frac{1}{7}$	0	7.24
$\frac{2}{7}$	0	7.25
$\frac{3}{7}$	0	7.27
$\frac{3}{7}$	$\frac{2.5}{7}$	7.28
"	$\frac{5}{7}$	6.94
"	$\frac{10}{7}$	6.10
"	$\frac{15}{7}$	6.08
"	$\frac{20}{7}$	6.09

During this period, no appreciable disintegration of aminosugars was observed.

TABLE V.  
Glucosamine hydrochloride or chondrosamine hydrochloride taken for analysis: 1 mg.

Amino acids added		Glucosamine hydrochloride			Chondrosamine hydrochloride		
kind	mg.	col. reading mm.	amount calc. from colour develop- ment. mg.	error %	colori- metric reading mm.	amount calc. from col. development. mg.	error %
Glycine	5				10.4	1.06	+ 6
	7.5				10.3	1.08	+ 8
	10	9.24	1.07	+ 7	9.74	1.14	+14
Alanin	5	9.72	1.00	0	10.5	1.03	+ 3
	7.5	9.58	1.03	+ 3	10.4	1.06	+ 6
	10	9.56	1.03	+ 3	9.98	1.08	+ 8
Glutamic acid	10	9.62	1.02	+ 2	10.42	1.02	+ 2
Histidine hydrochlorine	10	9.66	1.01	+ 1	10.70	0.98	- 2
Tyrosine	10	9.72	1.00	0	10.58	1.00	0



TABLE VI.  
Glucosamine hydrochloride analysed: 1 mg.

Sugar added		Time of heating hrs.	Recovery.		
kind	mg.		Col. reading mm.	Amount of glucosamine as chlorhydrate cal. from col. development. mg.	Error %
Mannose	25	3	10.0	0.96	-4
	"	4	9.8	0.99	-1
	"	5	9.75	1.00	0
	"	6	9.78	1.00	0
	50	5	9.78	1.00	0
Glucose	25	3	10.05	0.95	-5
	"	4	9.78	1.00	0
	"	5	9.74	1.00	0
	"	6	9.75	1.00	0
	50	5	9.77	1.00	0
Galactose	25	3	10.20	0.94	-6
	"	4	9.78	1.00	0
	"	5	9.75	1.00	0
	"	6	9.74	1.00	0
	50	5	9.77	1.00	0
Fructose	25	1	9.76	1.00	0
	"	2	9.76	1.00	0
	"	3	9.77	1.00	0
	50	4	9.76	1.00	0
Glucuronic acid	25	2	9.78	1.00	0
	"	3	9.75	1.00	0
	"	4	9.77	1.00	0
	50	1	9.90	0.98	-2

4. Additional experiments on protein hydrolysates: Table VII shows the results when 1.5 gm of Hammarsten's casein (E. Merck) and of gelatin (commercial) were hydrolysed by our method. In these examples, the hydrolysis mixtures were diluted to 25 cc. after addition of lead acetate.

TABLE VII.

Protein in solution taken for colorimetric estimation		Glucosamine hydrochloride added mg.	Chondro- samine hy- drochloride added mg.	Col. reading			Aminosugar pre-existent		
kind	mg.			mm.	cal. as glu- cosamine hy- drochloride mg.	calc. as chon- droamine hydrochloride mg.	calc. as glucos- amine hydrochloride mg.	%	as chondrosamine hydrochloride mg.
Casein	30	2	1.29	5.92	2.07		0.07	0.23	
	"			8.66		1.37			0.08
	50	1		9.04	1.11		0.11	0.22	0.27
	"	2		5.86	2.10		0.10	0.20	
	"	2		5.88	2.11		0.10	0.20	
Gelatin	"	2.5		5.00	2.63		0.13	0.26	
	"		1.29	8.44		1.43			0.14
	75	1		8.60	1.19		0.19	0.25	0.28
	30	2		5.92	2.07		0.07	0.23	
	"		1.29	8.62		1.38			0.09
	50	1		8.90	1.12		0.12	0.24	0.3
	"	2		5.84	2.105		0.105	0.21	
	"	2		5.86	2.10		0.10	0.20	
	"	2.5		5.10	2.60		0.10	0.20	
	"		1.29	8.36		1.44			0.15
	75	1		8.65	1.18		0.18	0.24	0.3

Irrespective of the quantity, either of the aminosugar added or of proteins, the figures denoting the amount of the pre-existent aminosugars remained approximately equal, both in casein and in gelatin. The results obtained on gelatin prove that even proteins with high contents of this aminoacid (25.5% in gelatin, Dakin) can be estimated exactly.

When 100 mg of the protein hydrolysates were taken, the brownish tint remaining after treatment with lead made the colour comparison difficult.

5. Tryptophans did not develop colour by itself.

We wish to express gratitude to the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for a grant towards the expenses of this work.

#### REFERENCES.

- Boyer, R. and Fürth, O. (1935): *Biochem. Zeits.*, **282**, 242.  
Elson, L. A. and Morgan, W. T. (1933): *Biochem. Journal*, **27**, 1824.  
Masamune, H. and Hoshino, S. (1936): *Journ. of Biochem.*, **24**, 219.  
Nilsson, I. (1936): *Biochem. Zeits*, **285**, 386.  
Onoe, T. (1936, i): *Journ. of Biochem.*, **24**, 1.  
„ (1936, ii): „ „ „ **24**, 9.  
Ozaki, G. (1936): *Journ. of Biochem.*, **24**, 73.

## ON THE SO-CALLED MUCOITINSULFURIC ACID (P. A. LEVENE) FROM GASTRIC MUCOSA.\*

By

GENEI OZAKI.

*(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imp. University,  
Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)*

(Received for publication, May 11, 1937.)

In his well known monograph Levene (1925) classified the carbohydrate complexes from gastric mucosa, serum mucoid and ovomucoid under the second subgroups of mucoitinsulphuric acid, barium salts of which being readily soluble in water and precipitable only by a large excess of glacial acetic acid in contradistinction to the members of the first subgroup. Mucoitinsulphuric acid was deemed by him to be composed similarly as chondroitinsulphuric acid, namely, of equimolecular acetylglucosamine sulphuric and glucuronic acids.

The view on the prosthetic group of ovomucoid was later altered by him with Mori (1929), but the new opinion that it is constituted of two molecules of mannose and one of acetylglucosamine is still incorrect with respect to the mutual molecular proportion of the two sugars. According to Masamune and Hoshino of this laboratory, the ratio is 1 to 1. As regards that of serum mucoid, it was demonstrated by the writer (1936) to be of an analogous composition to that of ovomucoid as was asserted by Levene and Mori. Gastric mucosa is now thus a lone member representing this sub-group. Recently preparations were obtained by Komarov (1935) by alkaline hydrolysis of gastric juice and the mucoprotein ("dissolved mucin") of the latter as well as from the mucin which was manufactured with hog gastric mucosa and

---

\* XXVII. Communications of "Biochemical Studies on Carbohydrates" (H. Masamune). A part of this report was read at the 12th annual meeting of the Biochemical Society of Japan, Sept. 1936.

were believed to be a mucoitinsulphuric acid in accordance with the classification of Levene. The claim was, however, based merely on the elemental-analytical data, the contents of sulphuric acid and the reduction powder of their hydrolysate and on their precipitability, so that Levene's description still remains worthy of careful perusal. The evidence which was obtained by experiments in our laboratory and is given below in detail, revealed that each three molecules of glucosamine, acetic and sulphuric acids, two of galactose and one of glucuronic acid are its constituents. This leads simultaneously to the conclusion that the category in question is to be wholly expunged.

#### EXPERIMENTAL.

##### *Isolation of barium salt of the carbohydrate complex from gastric mucosa plus mucus.*

The fourth stomach of a bull was employed. After rinsing off the food restings, the mucosa adhered with mucus was mechanically separated with precaution and minced by means of a masticator. The isolation of the substance from this was performed by following the procedures of Levene and López-Suárez (1918) with care but that the extraction was carried out by the addition of 10% NaOH up to 3% to the tissue suspension (gastric mucosa + mucus: water=1:1), as they did in 1916. Several trials proved that barium hydroxide is insufficient to split it up from the conjugated protein. The crude product was purified twice by repetition of the whole process and the yield of the hygroscopic and colourless powder thus obtained amounted to 0.15 gm per 1000 cc. of the fresh mucosa. It was clearly soluble in water. Biuret test, negative. Molisch test produced a violet zone at the junction between the two layers of solutions. The residue, after ignition with sodium carbonate and sodium peroxide, showed no ammonium molybdate test for phosphorus.

##### *Chemical properties.*

Analysis was made on the specimen dried constant in vacuo



On the so-called mucoitinsulfuric acid from gastric mucosa. 235

over  $P_2O_5$  at  $78^\circ C$ .

#### N

By the micro-Kjeldahl method,

6.07 mg substance:	0.15 mg N (2.47%)
4.48 „ „ :	0.11 „ „ (2.45 „)
	Average: 2.46%

#### Ash

By incineration,

95.76 mg substance:	30.12 mg ash (31.45%)
67.55 „ „ :	21.57 „ „ (31.93 „)
	average: 31.68%

#### *Aminosugar.*

It was identified with glucosamine as the tetrabenzoate in like manner as described in the communication on serum mucoid Ozaki (1936). The isolation was started by treatment of 500 mg of the polysaccharide with 30 cc. of fuming hydrochloric acid. Benzoylation was preceded by the addition of 30 cc. of 10% NaOH and subsequently 3 cc. of benzoyl chloride and the mixture was shaken for 30 minutes. The precipitates washed were then treated first with chloroform, next with alcohol and finally with methanol, each extraction being preceded by evaporation of the solution. The crystals in thin needles appeared from methanol on standing. F. P. was  $204^\circ$  and no depression was observed when mixed with glucosamine tetrabenzoate.

The estimation was carried out by the Masamune and Nagazumi method and the following figures were obtained:

Analysis No.	Substance taken		Glucosamine content	
	for hydrolysis mg.	for colorimetry mg.	mg.	%
1	36.6	4.392	1.02	23.3
2	„	2.828	0.66	23.7
3	41.7	3.336	0.83	24.9
4	„	5.004	0.12	24.2
			average:	24.0

*Hexuronic acid.*

Its existence was proved by the naphthoresorcinol test (Neuberg and Saneyoshi) and the aniline acetate test for furfural. It is inferred to be glucuronic acid by analogy from allied carbohydrate complexes heretofore investigated.

For quantitative analysis furfural was produced and titrated iodometrically as described formerly, and the glucuronic acid was calculated according to Tanabe.

35.0 mg substance:	3.674 mg glucuronic acid (10.5%)
65.1 " " :	6.742 " " " (10.4 " )
	average: 10.5%



By Suzuki's modification of the Friedrich and Sternberg method (saponification, 2 h by means of *p*-toluene sulphonic acid).

5.74 mg substance:	0.31 mg $\text{CH}_3 \cdot \text{CO}$ (5.40%)
6.10 " " :	0.37 " " (6.06 " )
	average: 5.73%



It was estimated gravimetrically as  $\text{BaSO}_4$ . Hydrolysis was conducted, according to Suzuki's proposal, by heating with 50 cc. of 1 n.  $\text{HCl}$  in a sealed tube for 10 hours in a boiling bath.

110.80 mg substance:	38.15 mg $\text{BaSO}_4$ ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ 14.46%)
----------------------	--

The values of  $\text{CH}_3 \cdot \text{CO}$  and of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  found are nearly equimolecular to that of glucosamine (conf. above and the result of fractional analysis below), namely, 5.73 versus 5.65 ( $\frac{23+24}{2} \times \frac{43}{179}$ ) and 14.46 versus 12.9 ( $= \frac{23+24}{2} \times \frac{98}{179}$ ) respectively.

*Fractional analysis of sugars by the Masamune  
and Tanabe method.*

295.5 mg of the substance were heated with 10 cc of 1.5 n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

# On the so-called mucoitinsulfuric acid from gastric mucosa. 237

- i Total reduction of the hydrolysate, calc. as glucose: 44.8% of the substance
- ii Reduction after treatment with phosphotungstic acid, calc. as glucose:  
42.4% of the substance
- iii After precipitation of glucuronic acid by means of lead and barium and  
following treatment with phosphotungstic acid, calc. as glucose:  
35.9% of the substance
- iv After removal of glucuronic acid and subsequently of aminosugar, calcs. as  
glucose: 11.6% of the substance

From these numbers, computation gave

Glucuronic acid:	7.0%
True sugar calc. as glucose:	11.6 „
„ galactose:	14.3 „
„ mannose:	11.8 „
Glucosamine:	23.0 „

Corrected for the decomposition of the sugars during hydrolysis, the percentages taken up by the various kinds of sugars reach.

Glucuronic acid:	8.0%
True sugar, calc. as galactose:	14.7 „
Glucosamine:	23.4 „

The mutual molecular ratio of the sugars is 1.0:2.0 (true sugar as galactose): 3.2, that is, approximately 1:2:3. The values of glucosamine and glucuronic acid are seen to coincide fairly well with those obtained above by the direct methods.

Similar results were obtained by hydrolysis with 1 n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  for 3 hours.

That the true sugar is galactose was decided by the colorimetric analysis of the final solution in the fractional analysis, as indicated in the accompanying table.

Percentage of substance in solution employed for colorimetry	Reaction	Percentage of the true sugar in the solution calc. as		
		Glucose	Galactose	Mannose
0.105	Orcinol	0.0209	0.015	0.0156
	Indole	0.0118	0.015	0.0168
	Diphenylamine I	0.0075*	0.0145	0.0075*

\* The solution was too dilute to read accurate values on the standard curves from the readings of the colorimeter.

A glance at the figures will show that the intensities of colour developed, coincide satisfactorily with one another when the sugar is assumed as galactose, while not in others. The mean value of galactose in the solution analysed is as much as 0.0148% which corresponds to 14.1% of the carbohydrate complex.

*Mucic acid reaction.*

Mucic acid could be formed as had been expected from the above experiment.

The process was as follows.

500 mg of the air dry substance was heated with 60 cc. of  $\text{HNO}_3$  (sp. gr. 1.15) on a bath until the volume was reduced to about 40 cc. The solution was centrifuged while warm in order to separate the precipitated barium sulphate and the supernatant liquid was condensed further to about 20 cc. It was stood over night at room temperature, then the precipitate was collected, washed with less than 10 cc. of water, and treated with a few drops of 0.2 n  $\text{NaOH}$ . The insoluble residue was removed by centrifugalization. On standing after acidification with one drop of 10%  $\text{HCl}$ , typical mucic acid crystals came out from the solution.

Information on the quantitative-analytical procedures and calculation method employed above (Masamune and Tanabe, Suzuki, and Tanabe) will be shortly furnished in this journal.

The expenses of this work were defrayed by a grant from the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan, which is gratefully acknowledged.

BIBLIOGRAPHY.

- Friedrich, A. u. Sternberg, H. (1936): *Biochem. Z.*, **286**, 20.  
Komarov, S. A. (1935): *J. Biol. Chem.*, **109**, 177.  
Levene, P. A. (1925): *Hexosamines and mucoproteins*. Longmans, Green & Co., London.  
Levene, P. A. and López-Suárez, J. (1916): *J. Biol. Chem.*, **25**, 511.  
" " " (1918): *J. Biol. Chem.*, **36**, 126.  
Levene, F. A. and Mori, T. (1929): *J. Biol. Chem.*, **84**, 50.  
Masamune, H. and Hoshino, S. (1936): *J. Biochem.*, **24**, 219.  
Masamune, H. and Nagazumi, Y. (1937): *J. Biochem.*, **26**, 225.  
Ozaki, G. (1936): *J. Biochem.*, **24**, 73.

## GLYCOPROTEINS FROM GASTRIC MUCOSA.\*

By

GENEI OZAKI.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University,  
Sapporo. Director: Professor H. Masamune.)

(Received for publication, May 11, 1937.)

This work was attempted with a view to deciding in what kind of mucoprotein the polysaccharide prepared from gastric mucosa Ozaki (1937) is involved as an integral part of it. Two glycoproteins were isolated as will be described, one of which, designated mucin, is precipitated by acetic acid and the other, mucoid, soluble in an acid solution. An analysis of them indicated the carbohydrate complex which appears to take up the whole prosthetic group of the latter and, if present, only a part of that of the former.

### EXPERIMENTS AND DISCUSSION.

#### *Preparation of glycoproteins from gastric mucosa.*

The mucosa with mucus separated mechanically and chopped, as noted in the former account, was treated for one day with an alcohol-ether mixture (three volumes of 95% alcohol+one volume of ether), dried by an air current and finally pulverized.

The preparation of mucoproteins was started with the material thus obtained.

#### *Mucin.*

A part of the dry material was shaken with ten parts of water and stood for 24 hours at room temperature after addition of 20% thymol solution (0.5 cc. to 10 cc. of the mixture), then the extract was collected first by percolation through a hump cloth, next by

---

\* XXVIII. Communication of "Biochemical Studies On Carbohydrates" (H. Masamune.) This paper was in part reported at the 12th annual meeting of the Biochemical Society of Japan, Sept. 1936.



squeezing the remainder out of the wet tissue and removed from the suspending particles by centrifugalization. The deposit which came out on acidification of the liquid to pH 3.5–4.0 by means of acetic acid was dried with 95% alcohol and subsequently with ether. The yield of this crude product, which contained much of phosphorus, was 96.87 gm per 1700 gm of the original material. It was then dissolved in water by the aid of the least requisite amount of 0.5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution (pH was raised to 7.2) and precipitated, after removal of the insoluble residue, at pH 3.0–4.0 with 30% acetic acid. As phosphorus still remained abundantly after another proceeding, it was retreated similarly three more times, replacing acetic acid with 0.1 n. HCl. The contamination was not as yet removed, although the quantity was reduced to 29.25 gm.

Fractionation with ammonium sulfate at various saturation was next tried on a part of it. But as it also gave no phosphorus free substance, all of the rest (12.6 gm) was finally taken up in 500 cc. of water, neutralized by the addition of dilute NaOH solution in drops and after removal of the undissolved part by centrifugalization, followed by acidulation to pH 6.8, and addition of NaCl up to 1%, the solution was boiled for 15 minutes in a porcelain dish, whereupon voluminous deposits came out. The latter was centrifuged, when cold, and washed. The combined supernatant liquor and washings were condensed on a bath, the reaction being maintained neutral, to a small volume and the coagulated protein removed and dialysed. From the solution, addition of HCl (10%) in minute portions did not deposit the substance well but caused merely turbidity of the solution although the hydrogen ion concentration was brought down as low as pH 2.0. On addition of alcohol (95%) of an equal volume, coarse flocculent precipitates were obtained. The latter were washed with many changes of dilute alcohol, 95% alcohol and ether in succession. Phosphorus was diminished but the last trace could not be eliminated after two more redissolution and reprecipitation. The amount obtained was 499.7 mg.

The product was white hygroscopic powder. It was dried constant in vacuo at 78°C over  $\text{P}_2\text{O}_5$  and submitted to analysis.

Lime water was found not suitable for the extraction of mucin from the tissue because of the property of the product which became less and less soluble on repetition of purification by the procedures employed above at first.

Troubles in purification of gastric mucin had been met with already by López-Suárez in 1913, who took gastric mucus as a source and noted, "Doch gelang es trotz verschiedener Versuche weder auf chemischem noch auf mechanischem Wege, die phosphorhaltige Substanz abzutrennen." Trials to prepare the pure specimen are still being carried on in this laboratory of which information will be given before long.

### *Mucoid.*

The dry gastric mucosa was stirred up with 25 parts of half saturated lime water and stood for two days. As an aseptic, alcoholic thymol solution was used as in the previous case. The extract, removed from the substance precipitable with acetic acid, was dialysed for two days and evaporated on a bath to a small volume and treated with 5 volumes of 95% alcohol. The deposit was then washed with alcohol, then with ether and dried. The crude product amounted to 53.6 gm. per 1100 gm. of the original material. The procedures were carried out over again, and 18.4 gm. of hygroscopic white powder were gained. It was clearly soluble in water and devoid of phosphorus.

From the water extract of the tissue, a substance was isolated with similar properties but the yield was less.

Protein reactions of the glycoproteins are listed as follow.

Reaction	Mucin	Mucoid
Colour reaction:		
Biuret reaction	+	+
Millon's test	+	+
Sakaguchi's test	+	+
Diazoreaction	orange	deep red
Molisch test	red ring at the junction between the two layers	red
Hopkins-Coles' test	+	+
Kiliani's test for deoxycarbohydrate	—	

Precipitation test		
By 2/3 saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	turbid	faintly turbid
Phosphotungstic acid	scarcely precip.	flocculent precip. (+)
Trichloroacetic acid	markedly turbid	turbid
Tannic acid	turbid	floc. precip. (+)
Mercuric acetate	floc. precip.	" " (+)
Ferricyanide acetic acid	—	—
lead subacetate	floc. vol. precip.	—
sat. lead acetate sol.	—	—

### Quantitative Analysis.

The methods described in the former account Ozaki (1937) were applied.

The figures obtained on mucin are shown in general in table I.

TABLE I.

N		Aminosugar as glucosamine by the Masamune and Nagazumi method				Hexuronic acid calc. as glucuronic acid from the amount of furfural produced		CH <sub>3</sub> ·CO		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
Substance taken for analysis	mg	Substance t. f. hydrolysis	mg	Substance t. f. colorimetry	mg	Substance t. f. a.	mg	Substance t. f. a.	mg	Substance t. f. a.	mg
%		%		%		%		%		%	
7.2	14.4	174.1	{	27.86	4.3	31.2	4.19	16.98	1.06	226.87	0.55
7.5	14.7			20.89	4.2	32.4	4.26				
average: 14.6				4.25		4.23		1.06		0.55	

Reduction of hydrolysate calc. as glucose %	Reduction of hydrolysate after treatment with phosphotungstic acid, calc. as glucose %	Aminosugar as glucosamine %	Hexuronic acid as glucuronic acid %	True sugar as galactose %
by fractional analysis* according to Masamune and Tanabe				
20.9	11.2	3.6	3.6	5.9

\* 91.8 mg were submitted to hydrolysis ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 12 cc of 1.5 n. solution; heating, 4 hours.)

As the specimen still contained phosphorus and accordingly, contamination with desoxyribose was not excluded, the colorimetric identification of the true sugar in the fractional analysis was not carried out. When calculated as galactose, the reducing power of this fraction corresponded to the quantity one and a half equivalent to the aminosugar.

The contents of glucuronic acid and the  $\text{CH}_3\text{CO}$ -radical are decidedly equivalent to the aminosugar, although there are some discrepancies between the values of a sugar obtained by the various methods.

The quantitative relation among the sugars differs widely from that of the carbohydrate complex isolated from gastric mucosa and moreover sulfur in the form of organic sulfate is much less than that calculation requires from the aminosugar content, though not so scarce as Kahlberg found in his preparation. The presence of the polysaccharide in search is not, however, disproved, because the writer limited himself to the analytical task and did not try to isolate it from the protein, owing to the lack of material. It is possible that it makes up a part of the whole prosthetic moiety.

#### *Mucoid.*

Hexuronic acid was detected by the naphthoresorcinol reaction (Neuberg and Saneyoshi) and the aniline test for furfural.

Glucosamine was isolated as the tetrabenzoate from the substance in the manners reported formerly (Ozaki, 1937), taking up 3 gm in 50 cc. of fuming hydrochloric acid. The evaporated residue of the hydrolysate was dissolved in 50 cc. of hot water, treated twice with animal black, first with two spoonfuls, next with one. Extraction of the benzylation product by means of chloroform was omitted. After recrystallization from methanol, it melted at  $203^\circ\text{C}$ . Determination of the mixed melting point was also made.

Most of quantitative-analytical data are seen in table II.

Identification of the true sugar was performed colorimetrically, after removing glucuronic acid, glucosamine and the reducing aminoacids from the hydrolysate by following the fractional

TABLE II.

N		Glucosamine by the Masamune and Nagazumi method		Hexuronic acid calc. as glucuronic acid from the amount of furfural produced		CH <sub>3</sub> ·CO		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
Substance taken for analysis mg	%	Substance t. f. hydrolysis mg	%	Substance t. f. a. mg	%	Substance t. f. a. mg	%	Substance t. f. a. mg	%
6.4	15.3	158.2	6.4	64.7	2.05	12.31	1.33	245.35	1.65
5.3	15.1		6.3	36.4	2.02	9.95	1.31	193.03	1.63
average:	15.2		6.4		2.04		1.32		1.64

analytical procedures. The estimation of the other kinds of sugar was not made, as there was not sufficient amount for this purpose on hand.

531.5 mg of the dry substance were dissolved in 12 cc. of 1.5 n. sulfuric acid and the solution was heated for 4 hours. The reducing power was:

After hydrolysis, calc. as glucose:	16.7% of the substance
After treatment with phosphotungstic acid, calc. as glucose:	12.9% " " "
After treatment with lead, barium and mercury, calc.	
as glucose:	3.3% " " "
as galactose:	4.1% " " "
as mannose:	3.4% " " "

Computed, by taking into consideration the partial decomposition during hydrolysis, galactose takes up 4.2%.

Colorimetric analysis:

Reaction	Reading of colorimeter mm.	Conc. of sugar in the solution, calcs. as		
		Glucose %	Galactose %	Mannose %
Orcinol	13.7	0.018	0.013	0.0135
Indole	19.8	0.010	0.013	0.014
Diphenylamine I.	29.4	0.0075*	0.0126	0.0075*

The conclusion reached from these figures is that galactose is the true sugar involved. The solution contained, in 100 cc., the hydrolysis of 0.32 gm of mucoid. Hence galactose exists as much as 4.2%, corrected for partial disintegration by treatment with hot acid.

The molecular relation among glucosamine, galactose and glucuronic acid was, therefore,

\* The colour development was not sufficient to read accurate values from the standard curves.



$$\frac{6.4}{179} : \frac{4.2}{180} : \frac{2.04}{194} = 3:2:0.9$$

which is approximately 3:2:1, and the quantity of  $\text{CH}_3\text{CO}$  was nearly equivalent to glucosamine. The facts suggest that the prosthetic group of mucoid consists of the polysaccharide isolated alone.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  reached only 1.64/3.53 of the calculated amount. Its too high content in the specimen of the preceding paper may be ascribed to an impurity admixed during the preparation.

The writer wishes to express his thanks for a grant from the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan by which the expenses of this investigation were defrayed.

#### BIBLIOGRAPHY.

- Kahlberg, O. (1936): Hoppe-Syler's Zeits., **240**, 55.  
López-Suárez, J. (1913): Biochem. Zeits., **56**, 167.  
Masamune, H. and Nagazumi, Y. (1937): J. Biochem., **26**, 225.  
Ozaki, G. (1937): J. Biochem., **26**, 233.

## ON THE INFLUENCE OF URETHANE ANAESTHESIA UPON THE GASEOUS CONTENT OF THE BLOOD.

(Blood gas Studies performed with a New Micro Blood Gas Apparatus. III)

By

KOICHIRO SAITO AND CHIN KAI SHUEH.

(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial  
University. Director: Prof. Dr. R. Shoji.)

(Received for publication, May 14, 1937.)

### INTRODUCTION.

The influence of urethane upon the blood gases was studied by Rakieten, Nahum, DuBois, Gildea and Himwich (1934) using the Van Slyke and Neill apparatus. The experiments were performed upon dogs. They proved that urethane decreased the content and the capacity of  $\text{CO}_2$  in the blood while increasing the content and the capacity of  $\text{O}_2$ . According to the data given in their paper, the  $\text{CO}_2$  content, the  $\text{O}_2$  content and also the  $\text{O}_2$  capacity showed maximum deviations from their normal values 65 minutes after the administration of urethane, and subsequently they gradually approached their normal values. It is generally accepted that the decrease in the  $\text{CO}_2$  content of the blood during anaesthesia is due to the increase of acid substances in the blood. Matakas (1931) observed an increased concentration of lactic acid in the blood during urethane anaesthesia. From the observed increase in the  $\text{O}_2$  content and the  $\text{O}_2$  capacity of the blood, Rakieten et al. presumed a concentration of the blood during urethane anaesthesia.

According to Hirayama (1926), however, the  $\text{O}_2$  content as well as the  $\text{O}_2$  capacity sustained no change 3~4 hours after the injection of a narcotic dose of urethane; but after 12 hours both of these suffered a considerable reduction.

On the other hand, an increase in the concentrations of haemo-

globin and red cells in response to urethane was found in rabbits by Boycott and Price Jones (1922) by means of haemocytometry. Recently, Adolph and Gerbasi (1933) also observed the same in dogs by measuring the refractive index, the specific gravity and the dry residue of the plasma and also the cell volume, the specific gravity and the dry residue of the whole blood.

For experiments in which urethane is used as an anaesthetic upon animals, it is important to make clear the state of the blood gases for several hours after the beginning of anaesthesia. For this purpose, however, the data of Rakieten et al. and also of Hirayama are insufficient and their results conflict with each other. The purpose of the present research was to clear up this point.

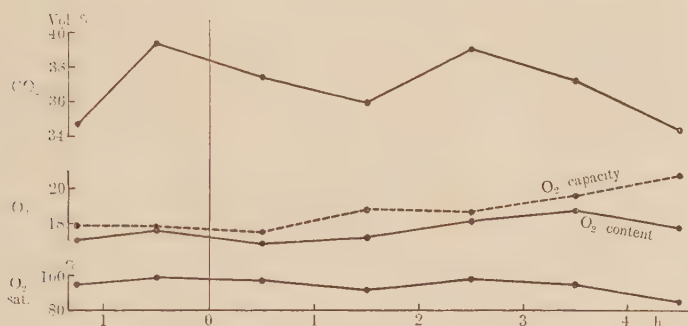
#### EXPERIMENTS.

For experimental animals, rabbits of 2.1~2.9 kg weight were used. In order to minimize as much as possible the effect of successive drawings of blood samples upon the blood constituents, the analysis was performed with a micro-blood gas apparatus (Saito, 1937) which is applicable to 0.1 cc. of blood. A rabbit was fixed on its back and its femoral artery from which blood samples were to be taken, was exposed and clamped off. 1~2.5 hours after the fixation, the animal received urethane in a dose of 0.7~1.5 gm per kg body weight by hypodermic injection. Control blood samples were drawn several times before the application of urethane. Afterwards, samples were taken in most cases at intervals of 30~60 minutes for 3~4 hours. Each time a blood sample was collected from the femoral artery in two micro-pipettes, the one for CO<sub>2</sub>- and O<sub>2</sub>-analysis, the other for measuring the O<sub>2</sub> capacity. The O<sub>2</sub> capacity was estimated by analysing the blood saturated with a sufficient amount of air in the syringe attached to the micro-pipette. Oxygen which dissolved physically in the blood was subtracted from the observed capacity and the real amount of oxygen bound by haemoglobin was found. In experiments performed with splenectomized rabbits the O<sub>2</sub> capacity was computed from the reading of the Sahli haemometer by multiplying

it with a factor obtained empirically for this purpose. From the  $O_2$  content and the  $O_2$  capacity, the  $O_2$  saturation was calculated.

Results of experiments carried out with intact rabbits under urethane anaesthesia are given in Protocols I~V. As an example, the data of Protocol I are plotted in Fig. 1. The first blood sample

Fig. 1.

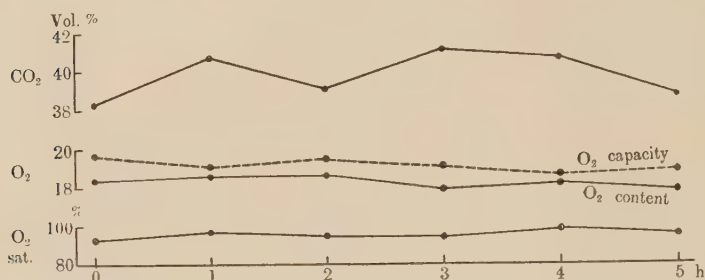


was collected immediately after the preparation of the femoral artery, and its  $CO_2$  content was generally found, as can be seen in the protocols, to be lower than the succeeding one, owing to the preceding over-ventilation caused by the operation. Bearing this fact in mind, we see that the  $CO_2$  content begins to decrease within 30~60 minutes after the urethane application and continues to decrease until the end of the experiment. On the other hand, the  $O_2$  content and the  $O_2$  capacity begin to increase at almost the same time that the decrease in the  $CO_2$  content begins, and grows progressively or approaches a certain high level with the lapse of time. Thus, the courses of the changes in the gaseous content of the blood differ markedly from those reported by Rakieten et al. or Hirayama. Of the five experiments, the one corresponding to Protocol V is an exceptional case, in which the gaseous content of the blood remains unchanged after the injection of urethane. In each experiment the  $O_2$  saturation takes a constant value during the whole course of the experiment. In other words, the partial pressure of the oxygen in the arterial blood suffers no change from the urethane injection.

In order to determine whether or not the changes in the content of the blood gases described above is due to the action of urethane, we performed the following two control experiments.

(a) On an unanaesthetized rabbit, the same observations as are described above were carried out at intervals of about 1 hour for 5 hours. Results are given in Protocols VI and VII. Fig. 2

Fig. 2.

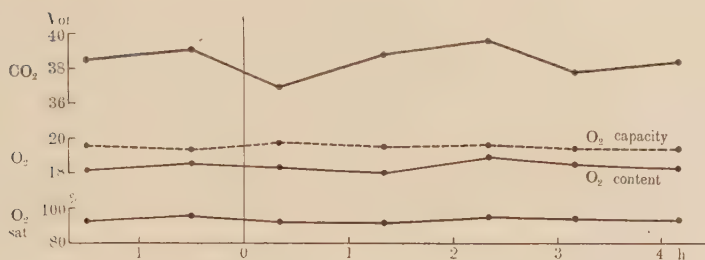


is the corresponding graph of the former. Here we see that the CO<sub>2</sub> content shows a fairly constant value or a gradual descent, while the O<sub>2</sub> content and the O<sub>2</sub> capacity correspondingly decrease. The O<sub>2</sub> saturation remains almost unchanged during the whole course of the experiment.

(b) 3.64 per cent saline solution, isotonic to the 20 per cent urethane solution used, was injected subcutaneously into an intact rabbit and the blood gases were analysed in a way similar to that described above. The results are given in Protocols VIII and IX. The former is plotted in Fig. 3. Here the CO<sub>2</sub> content, the O<sub>2</sub> content and the O<sub>2</sub> capacity remain unchanged throughout the experiment.

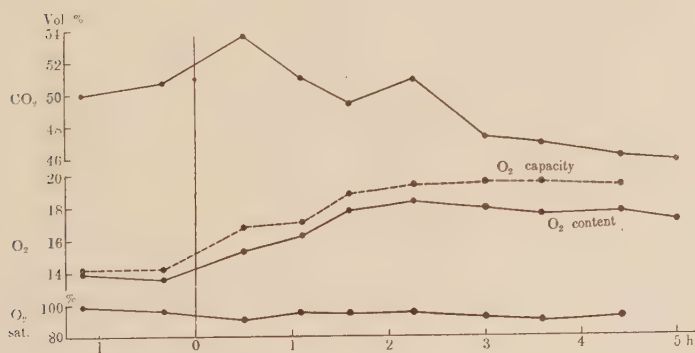
From these facts, there is no doubt that the changes in the gaseous content of the blood observed in the first group of experiments were caused by the action of urethane. The reduction of the CO<sub>2</sub> content after urethane application has generally been regarded as a consequence of acidosis. But it is inconceivable that the excess of acid substance produced in the tissue is a consequence of the O<sub>2</sub> deficit, because the O<sub>2</sub> tension of the arterial

Fig. 3.



blood suffers no change during the anaesthesia. The increase in the O<sub>2</sub> capacity indicates an increased concentration of haemoglobin in the blood under urethane. In order to determine whether or not the spleen plays an important role in this increase, similar experiments were carried out on previously splenectomized rabbits. The results are given in Protocols X~XIII. Fig. 4 corresponds

Fig. 4.



to Protocol X. The results were in general the same as those previously observed in the case of intact rabbits. Consequently, it is possible that some organs other than the spleen were causing the increased concentration of haemoglobin in the blood during urethane anaesthesia.



## SUMMARY.

When a rabbit is anaesthetized with urethane (0.7~1.5 gm per kg weight), the CO<sub>2</sub> content of the blood begins to decrease 30~60 minutes after the injection of the drug and continues to decrease, while the O<sub>2</sub> content and the O<sub>2</sub> capacity tend gradually to ascend with the decrease in the CO<sub>2</sub> content. The O<sub>2</sub> saturation estimated from the O<sub>2</sub> content and the O<sub>2</sub> capacity, i.e., the O<sub>2</sub> tension of the arterial blood, suffers no change from urethane anaesthesia. The rise in the O<sub>2</sub> capacity indicates an increased concentration of haemoglobin in the blood. Similar experiments performed on splenectomized rabbits confirmed the fact that the spleen plays no important role in the mechanism of the increase in haemoglobin concentration during urethane anaesthesia.

The expenses of this research were defrayed by a grant from the Educational Department of the Government for research in natural science.

## REFERENCES.

- Adolph and Gerbasi (1933): *Amer. J. of Physiol.*, **106**, 35.  
 Boycott and Price Jones (1922): *J. of Pathol. and Bacteriol.* **25**, 335.  
 Hirayama (1926): *Tohoku J. of Exper. Med.*, **7**, 364.  
 Matakas (1931): *Naunyn-Schmiedebergs Archiv*, **163**, 493.  
 Rakieten, Nahum, DuBois, Gildea and Himwich (1934): *J. of Pharmacol. and Exper. Therapeutic*, **50**, 328.  
 Saito (1937): *J. of Biochemistry*, **25**, 79.

## PROTOCOL I.

Blood gases of an intact rabbit before and after urethane injection.

Rabbit: ♂, 2.4 kg; Urethane: 1.5 mg per kg weight.

Time		CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> capacity	O <sub>2</sub> saturation
		Vol. %	Vol. %	Vol. %	%
Before injection	h m				
	1.50	34.7	17.0	17.9	95
	30	39.4	17.6	17.8	99
After injection	30	37.5	16.9	17.5	97
	1.30	36.1	17.2	18.8	92
	2.30	39.2	18.2	18.7	98
	3.30	37.4	18.8	19.7	95
	4.30	34.5	17.8	20.9	85

## PROTOCOL II.

Blood gases of an intact rabbit before and after urethane injection.

Rabbit: ♂, 2.9 kg; Urethane: 0.7 gm per kg weight.

Time		CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
	h m	Vol. %	Vol. %
Before injection	2.45	25.7	18.3
	2.25	36.7	17.5
	1.55	39.5	17.5
	1.15	40.9	17.6
	35	39.6	17.0
After injection	5	38.9	16.8
	15	39.1	17.8
	35	37.0	17.2
	1.00	35.8	17.9
	1.50	36.4	18.0
	2.25	35.4	18.6
	3.10	35.0	18.8

## PROTOCOL III.

Blood gases of an intact rabbit before and after urethane injection.

Rabbit: ♂, 2.4 kg; Urethane: 0.8 gm per kg weight.

Time		CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> capacity	O <sub>2</sub> saturation
	h m	Vol. %	Vol. %	Vol. %	%
Before injection	1.50	51.3	18.7	19.6	95
	1.20	49.9	18.5	19.8	93
	50	44.4	19.0	20.1	95
	15	47.5	18.8	19.4	97
After injection	30	47.5	18.6	19.5	95
	1.00	46.0	18.9	19.6	96
	2.00	43.0	19.4	20.3	96
	2.45	45.6	19.7	20.4	97
	3.30	44.2	19.3	20.4	95
	4.10	45.5	19.2	20.2	95

## PROTOCOL IV.

Blood gases of an intact rabbit before and after urethane injection.  
 Rabbit: ♂, 2.7 kg, Urethane: 1.5 gm per kg weight.

Time		CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> capacity	O <sub>2</sub> saturation
	h m	Vol. %	Vol. %	Vol. %	%
Before	3.00	39.2	17.5	19.4	95
injection	1.50	38.5	19.4	20.1	97
	45	40.2	18.0	19.3	93
After	25	39.1	20.2	21.4	94
injection	1.30	35.0	21.6	24.9	87
	2.45	—	—	23.9	—
	2.25	33.5	22.6	23.3	97

## PROTOCOL V.

Blood gases of an intact rabbit before and after urethane injection.  
 Rabbit: ♀, 2.7 kg, Urethane: 1.5 gm per kg weight.

Time		CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> capacity	O <sub>2</sub> saturation
	h m	Vol. %	Vol. %	Vol. %	%
Before	2.15	39.5	17.7	19.5	91
injection	55	38.3	18.1	18.8	96
After	20	38.5	18.0	19.7	91
injection	1.00	36.7	17.0	19.8	86
	2.00	38.8	17.9	18.7	96
	3.00	39.6	17.4	19.6	89
	4.00	37.7	17.9	19.9	90

## PROTOCOL VI.

Blood gases of an intact rabbit.  
 Rabbit: ♂, 2.6 kg.

Time	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> capacity	O <sub>2</sub> saturation
h	Vol. %	Vol. %	Vol. %	%
0	38.3	18.4	19.7	93
1	40.7	18.6	19.1	97
2	39.1	18.6	19.5	95
3	41.1	17.9	19.1	94
4	40.6	18.2	18.6	98
5	38.6	17.8	18.8	95

## PROTOCOL VII.

Blood gases of an intact rabbit.

Rabbit: ♂, 2.4 kg.

Time	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> capacity	O <sub>2</sub> saturation
h m	Vol. %	Vol. %	Vol. %	%
0	40.1	18.5	20.1	92
1.00	41.6	17.0	18.9	90
2.10	38.9	17.4	18.1	96
3.30	39.3	17.7	18.0	98
4.35	38.4	17.2	17.5	98
5.30	38.3	16.3	17.9	91

## PROTOCOL VIII.

Blood gases of an intact rabbit before and after injection of a 3.64% saline solution.

Rabbit: ♀, 2.7 kg; Saline solution injected: 4.2 cc per kg weight.

Time		CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> capacity	O <sub>2</sub> saturation
	h m	Vol. %	Vol. %	Vol. %	%
Before injection	1.30	38.5	18.2	19.6	93
	30	39.1	18.6	19.4	96
After injection	20	37.0	18.4	19.8	93
	1.20	38.9	18.1	19.6	92
	2.20	39.7	19.0	19.7	96
	3.10	37.9	18.6	19.5	95
	4.10	38.5	18.4	19.5	94

## PROTOCOL IX.

Blood gases of an intact rabbit before and after injection of a 3.64% saline solution.

Rabbit: ♀, 2.4 kg; Saline solution injected: 6.9 cc per kg weight.

Time		CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> capacity	O <sub>2</sub> saturation
Before injection	h m 30	Vol. % 34.5	Vol. % 18.4	Vol. % 19.4	% 95
After injection	25	35.8	18.7	19.5	96
	1.20	33.7	18.3	18.9	97
	2.45	36.9	18.1	19.4	93
	3.30	35.5	18.4	19.1	96
	4.20	35.4	18.4	19.3	95

## PROTOCOL X.

Blood gases of a splenectomized rabbit before and after urethane injection.  
 Rabbit: ♀, 2.1 kg; Splenectomy: 14 days before the experiment;  
 Urethane: 1.5 gm per kg weight.

Time		CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> capacity	O <sub>2</sub> saturation
	h m	Vol. %	Vol. %	Vol. %	%
Before injection	1.10	50.0	14.0	14.2	99
	20	50.8	13.6	14.2	96
After injection	30	53.7	15.3	16.8	91
	1.05	51.1	16.3	17.1	95
	1.35	49.5	17.8	18.8	95
	2.15	51.0	18.4	19.4	95
	3.00	47.4	18.0	19.6	92
	3.35	47.0	17.6	19.6	90
	4.25	46.2	17.8	19.4	92
	5.00	45.9	17.2	—	—

## PROTOCOL XI.

Blood gases of a splenectomized rabbit before and after urethane injection.  
 Rabbit: ♀, 2.5 kg; Splenectomy: 27 days before the experiment;  
 Urethane: 1.2 gm per kg weight.

Time		CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> capacity	O <sub>2</sub> saturation
	h m	Vol. %	Vol. %	Vol. %	%
Before injection	2.10	34.0	13.3	16.7	80
	50	37.8	16.5	16.5	100
	20	38.8	13.2	16.5	80
After injection	10	36.1	15.5	16.5	94
	40	37.6	16.7	16.5	101(?)
	1.00	38.0	16.1	16.8	96
	1.50	37.2	16.5	16.8	98
	2.40	35.7	15.2	16.8	90
	3.20	35.2	16.8	17.0	99
	3.50	36.1	16.3	17.3	94
	4.30	30.3	15.4	17.0	91

## PROTOCOL XII.

Blood gases of a splenectomized rabbit before and after urethane injection.

Rabbit: ♀, 2.4 kg; Splenectomy: 14 days before the experiment;

Urethane: 1.3 gm per kg weight.

Time		CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
	h m	Vol. %	Vol. %
Before injection	1.20	49.3	19.4
	45	54.0	18.7
	15	45.0	20.5
After injection	15	49.4	18.7
	50	50.1	19.3
	1.35	43.3	20.6
	2.15	46.0	20.3
	2.55	45.1	19.8
	3.25	40.1	20.8
	3.55	34.4	20.7
	4.30	33.8	20.2
	5.00	31.5	20.8

## PROTOCOL XIII.

Blood gases of a splenectomized rabbit before and after urethane injection.

Rabbit: ♀, 2.4 kg; Splenectomy: 23 days before the experiment;

Urethane: 1.5 gm per kg weight.

Time		CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> capacity	O <sub>2</sub> saturation
	h m	Vol. %	Vol. %	Vol. %	%
Before injection	3.30	38.6	17.5	18.1	97
	2.55	41.4	18.0	18.5	97
	2.00	48.1	17.6	18.3	96
	1.25	50.0	18.7	19.0	98
	45	48.1	19.2	19.3	99
	5	44.5	19.1	19.4	98
After injection	30	47.3	19.2	20.1	96
	1.15	43.4	20.0	20.7	97
	1.50	45.3	20.4	21.1	97
	2.30	44.3	20.1	21.6	93
	3.10	47.2	21.2	21.4	99
	3.50	46.9	21.3	21.3	100





## ÜBER DIE PHENOLSULFATASE.

VON

KAZUYOSHI MORIMOTO.

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie  
zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 20. Mai 1937)

Über die Hydrolyse des Schwefelsäureesters durch tierische Organe sind eingehende Untersuchungen schwer auszuführen, da die in den Organen vorhandene Phenolsulfatase nur eine schwache Wirkung zu entfalten vermag. Bisher wurde die Phenolsulfatase derart bemessen, dass man entweder das abgespaltete anorganische Sulfat als Bariumsalz wiegt oder nach Entfernung desselben den zurückgebliebenen Schwefelsäureester erst hydrolysiert, um die entstehende Schwefelsäure dann als Bariumsalz zu wiegen. Bei derartigem Verfahren muss, abgesehen von den mit der Gewichtsanalyse verbundenen Lästigkeiten, die Konzentration des Schwefelsäureesters mehr oder weniger gross sein, um die zur Ausführung der Gewichtsanalyse hinreichende Bariumsulfatmenge zu bekommen, was natürlicherweise mit dem Nachteil verbunden ist, dass selbst in der gepufferten Lösung mit dem Fortschreiten der Hydrolyse eine Aziditätveränderung schwer zu verhüten ist. Es ist auch klar, dass man mit dem Zusatz von Calcium- oder Bariumcarbonat, wie es bisher oft ausgeführt wurde, die Sulfatasewirkung wohl bei neutraler Reaktion aber leider nicht in saurer Reaktion verfolgen kann. Unter solchen Versuchsbedingungen ist die Untersuchung über die pH-Abhängigkeit selbstverständlich ausser Rede. Es gibt ausserdem eine Methode, die erlaubt, eine kleine Menge Schwefelsäure an Hand des Benzidins zu bestimmen. Zum Fermentversuch, der in verschiedenartig veränderter Azidität mit Pufferzusatz ausgeführt wird, ist diese Methode leider nicht am Platze, da die Ausfällung des Benzidinsulfats sowohl von der Azidität als auch vom Elektrolytengehalt der Lösung stark beeinflusst wird und die Bedingung zur quantitativen Gewinnung des

Benzidinsulfats aus mannigfaltig zusammengesetzten Lösungen noch nicht genug erforscht worden ist. So habe ich die Bestimmung der aus dem Schwefelsäureester freigewordenen OH-Verbindungen in Erwägung gezogen und *p*-nitrophenolschwefelsaures Kalium zum Versuche herangezogen.

Dieses Substrat wurde schon früher von Neuberg (1925) fermentativ als spaltbar bezeichnet. Aus dem Hydrolysengemisch hat er *p*-Nitrophenol isoliert und gewogen. Es war in äquivalentem Verhältnis mit der abgelösten Schwefelsäure. Ich bemerkte eine Eigenschaft des *p*-Nitrophenols, dass es sich nämlich bei alkalischer Reaktion gelb verfärbt, was auch bei sehr schwacher Verdünnung in Erscheinung tritt. Auf diese Weise kann man eine sehr verdünnte *p*-Nitrophenolsulfatlösung zum Experimente, selbst mit tierischen Organen von schwacher Sulfatase, heranziehen und es gibt auch bei weit fortgeschrittener Hydrolyse keine Gefahr gewisser Aziditätveränderung der Versuchslösung, da die bei der Hydrolyse entstehende Schwefelsäure nur eine kleine Menge beträgt. Die Konzentrationsermittlung des gelb gefärbten *p*-Nitrophenols kann man mittels Stufenphotometers leicht ausführen. Dieser Apparat ist jedoch nicht in jedem Laboratorium verwendbar. Die Kolorimetrie einer gelben Lösung ist mit den in den Laboratorien überall verwendeten Kolorimetern schwer ausführbar, doch gelang es mir auf folgende Art leicht zum Ziele zu kommen; man füllt eine aus Objektgläsern konstruierte Cuvette mit 0.01 oder 0.005% Filterblau (Agfa) in 5% Gelatinelösung und legt sie bei der Kolorimetrie auf das Okular des Kolorimeters auf. An Stelle von Filterblau kann man auch Berlinerblau verwenden.

Um die Konzentration des zum Versuch heranzuziehenden Substrates zu bestimmen, wurden 5.0 ccm *p*-Nitrophenol-Lösung von verschiedener Konzentration in einen 10 ccm Messzylinder genommen und durch Zusatz von 4.0 ccm 30% Na-Carbonat alkalisiert und mit Wasser bis zur Marke gefüllt, wobei natürlich im Falle einer starken Konzentration des *p*-Nitrophenols die Konzentration und die Farbintensität nicht parallel waren. Aber bei  $M/2000$ – $M/8000$  konnte ich eine Parallelität finden, so dass

ich beim Fermentversuch die Endkonzentration des *p*-Nitrophenolsulfats zuletzt auf *M*/2000 einstellte.

Die Zusammensetzung der Versuchslösung war folgende.

<i>M</i> /1000 <i>p</i> -Nitrophenolsulfat	10.0 ccm
Pufferlösung	5.0 „
Fermentlösung	a „
Wasser	5.0–a „

Als Antisepticum wurde ein Körnchen Thymol zugesetzt.

Zur Verfolgung der Hydrolyse wird 5.0 ccm Gemisch in ein Reagenzglas genommen, dieselbe Menge 10% iger Trichloressigsäure hinzugesetzt und filtriert. So beträgt im Filtrat die Konzentration des gesamten *p*-Nitrophenols *M*/4000. Dann werden 5.0 ccm davon in einen 10.0 ccm fassenden Messzylinder pipettiert und, wie oben beschrieben, durch Zusatz von 4.0 ccm Na-Carbonat alkalisch gemacht und mit Wasser auf 10.0 ccm gefüllt. Je nach der dabei auftretenden Verfärbung wird als Vergleichslösung 5.0 oder 1.0 ccm von *M*/4000 *p*-Nitrophenol-Lösung genommen, die ebenfalls alkalisiert und auf 10 ccm aufgefüllt wird. Den Hydrolysegrad kann man damit kolorimetrisch leicht bestimmen.

*Als Vorversuch habe ich natürlich folgendes bestätigt:*

1) Eine bestimmte Menge *p*-Nitrophenol in Trichloressigsäurelösung äussert auch im Falle der nachherigen genügenden Alkalisierung mit 4 ccm Na-Carbonat dieselbe Intensität der Verfärbung wie beim Fehlen des Trichloressigs.

2) Die zum Versuche verwendeten Pufferlösungen üben keinen Einfluss auf den Farbgrad aus.

3) *p*-Nitrophenol wird bei Enteiweissung durch Trichloressigsäure an Eiweissniederschlag nicht adsorbiert.

Als orientierender Versuch wurde die Wirkung der Taka-diastase auf das *p*-Nitrophenolsulfat untersucht. 3 ccm dialysierte 5% Taka-fermentlösung war zu stark; es wurden daher nur 1 ccm davon zum Versuch gebraucht. Wie aus Tabelle I ersichtlich, wurde das Optimum zwischen 5.0–5.6 beobachtet. Als ich noch genauer auf dem Gebiet zwischen PH 5.0 und 5.8 experimentierte, erwies sich die Hydrolyse bei PH 5.2 am grössten (Tabelle II).

Die Kontrollversuche ohne Substrat bei verschiedenem  $P_H$  zeigten nach Alkalisieren keine Verfärbung.

Ferner wurde die Taka-fermentlösung gemäss dem nachfolgenden Gemisch bei  $P_H$  5.9 zum Versuche herangezogen, wobei die Differenz des bei beiden Fällen ermessenen *p*-Nitrophenols gerade mit der anfänglich zugesetzten *p*-Nitrophenolmenge gleich nachgewiesen wurde. *p*-Nitrophenol hemmt also in verdünnter Lösung die Sulfatase nicht.

<i>M</i> /100 <i>p</i> -Nitrophenolsulfat	1.0 ccm
<i>M</i> /1000 <i>p</i> -Nitrophenol oder Wasser	10.0 „
Puffer	8.0 „
Taka-fermentlösung	1.0 „

Die Anwesenheit der Phenolsulfatase in der Leber wurde von Neuberg (1925) gefunden. Ich habe die Extraktion des Ferments aus Kaninchenleber versucht.

Der Organbrei wurde mit 10 fachem Volumen Wasser vermischt und zum Teil sofort abzentrifugiert und zum Teil nach eintägigem Aufenthalt im Eisschrank oder Brutschrank abzentrifugiert. Je 3.0 ccm auf diese Weise erhaltenen Extrakts wurden als Fermentlösung verwendet und bei verschiedenem  $P_H$  auf Hydrolyse des *p*-Nitrophenolsulfats geprüft, wobei man aber in keinem Fall eine fermentative Spaltung beobachten konnte. So kann man sagen, dass die Extraktion der Organsulfatase nicht leicht durchzuführen sei. Mit Rücksicht auf die Tatsache, dass Rohruckerlösung zur Asparaginase- oder Histozymentextraktion als sehr vorteilhaft von Suzuki (1936) und Akizuki (1937) erwiesen wurde, stellte ich dann Zuckerextrakt aus dem Leberbrei her. Als 3.0 ccm dieses Extrakts zum Experiment (Tabelle III) verwendet wurde, konnte ich deutliche Fermentwirkung feststellen. Sie war bei  $P_H$  5.9 am stärksten, die Hydrolyse betrug nach 24 Stunden 11%. Die sulfatatische Wirkung dieses Leberauszugs ist jedoch nicht sehr stark. Daher habe ich 10.0 ccm des Extrakts zum Versuch gebraucht (Tabelle IV). Der hydrolytische Prozentsatz erhöhte sich nicht bedeutend, aber das Optimum war wieder  $P_H$  5.9.

Weiter wurde ein Glycerinextrakt der Kaninchenleber bereitet

und 3 ccm davon zum Versuche verwendet. Die grösste Hydrolyse war bei  $\text{pH}$  5.9 und 6.9 zu beobachten und sie betrug 21% (Tabelle V). Die Wirkung des Glycerinextrakts war ebenfalls nicht sehr stark.

Weiter wurde der beim obigen Versuch verwendete Glycerinextrakt im Eisschrank aufbewahrt und nach einer Woche wieder mit je 10 ccm bei verschiedenem  $\text{pH}$  auf den Sulfatasegehalt experimentiert. Die Hydrolyse erfolgte bei  $\text{pH}$  5.9 am stärksten, aber sie war 16% (Tabelle VI), also schwächer als vor der Aufbewahrung. Die Organsulfatase ist also labil und der Extrakt blüsst beim Aufbewahren auch bei niedriger Temperatur allmählich seine Wirkung ein. Daher ist der Leberextrakt bei jedem Experiment frisch zu bereiten. Man merkt ausserdem aus den obigen Ergebnissen mit der Lebersulfatase, dass die nach 48 Stunden beobachtete Hydrolyse bei jedem  $\text{pH}$  fast keine Abweichung von derjenigen nach 24 Stunden aufwies, was wieder auf die Labilität der Sulfatase hinweisen kann.

Bei den oben angeführten Experimenten darf man immerhin auch die Möglichkeit in Erwägung ziehen, dass das bei der Hydrolyse entstehende Nitrophenol aus gewissem Grunde in eine durch Alkali nicht färbbare Substanz verwandelt wurde. So wurde anstelle von  $p$ -Nitrophenolsulfat  $M/1000$   $p$ -Nitrophenol verwendet und auf obenbeschriebene Weise bei  $37^\circ$  24 Stunden gelassen, aber dabei wurde das  $p$ -Nitrophenol fast in seiner ganzen Menge wiedergefunden.

Ich konnte ausserdem die Möglichkeit ausschliessen, dass der Stillstand der Hydrolyse nach 24 Stunden eventuell mit der rücklaufenden Synthese des Esters zusammenhänge. Der bei  $\text{pH}$  6.9 in folgender Weise angestellte Versuch ergab, dass das anfänglich vorhandene  $p$ -Nitrophenol nach 24 Stunden in ganzer Menge wieder nachgewiesen wurde.

$M/1000$ $p$ -Nitrophenol	10.0 ccm
$M/100$ Schwefelsaures Kalium	1.0 „
Pufferlösung	6.0 „
Glycerinextrakt	3.0 „

Die Sulfatase in dem Glycerinextrakt ist also labil und auch



im Vergleich mit der Takasulfatase sehr schwach wirksam. Diese geringe Aktivität kann jedoch nicht dem beigemischten Glycerin oder dem im Glycerinextrakt vermutlich vorhandenen hemmenden Körper zugeschrieben werden, weil erstens die Hydrolyse des *p*-Nitrophenolsulfats durch das Gemisch von Takaferment und Leberglycerinextrakt gerade die Summe derjenigen durch die einzelne Fermentlösung war (Tabelle VII) und zweitens der Glycerinzusatz keinen merklichen Einfluss auf die Wirkung des Takaferments ausgeübt hat (Tabelle VIII).

Bei den Versuchen mit dem Leberglycerinextrakt entstand in den Proben, als sie bei 37° gelassen wurden, schon in 4–5 Stunden reichlicher Niederschlag, während der Ansatz mit der Takafermentlösung ganz klar blieb. Jene Niederschlagbildung hat sicher mit der Herabsetzung der Sulfatasewirkung zu tun. Um den Eiweissgehalt des Glycerinextrakts zu vermindern, habe ich ihn bei verschiedener Temperatur  $\frac{1}{2}$ –1 Stunde erwärmt und von dem Niederschlag befreit, weil ein solches Verfahren von Akizuki (1937) bei dem Histozyt mit gutem Resultat ausgeführt wurde. Aber bei der Sulfatase verursachte die Erwärmung immer eine Herabsetzung der Aktivität.

Ferner wurde der Glycerinextrakt mit verschiedenen Adsorbentien geschüttelt, wobei meistens eine Herabsetzung der Wirkung oder gar keine Veränderung nachgewiesen wurde. Nur beim Versuche mit dem Glycerinextrakt, der mit rotem Eisenhydroxydgel vorbehandelt wurde, liess sich eine Steigerung der Wirkung konstatieren: Bei  $\text{pH}$  5.9 erfolgte eine 43% ige Hydrolyse nach 22 Stunden (Tabelle IX), während der unbehandelte Extrakt in derselben Zeit 21% Hydrolyse zeigte.

An dieser Aktivitätssteigerung handelt es sich vielleicht nicht um die Entfernung des vermeintlichen Hemmungskörpers, sondern vielmehr um den verminderten Eiweissgehalt des Glycerinextrakts, weil die Taka- und Leber-Sulfatase angesichts der gleichen Lage des  $\text{pH}$ -Optimums als von demselben Typus angenommen werden müssen und, wie oben erwähnt, die Wirkung des Takaferments durch die Anwesenheit des Glycerinextrakts unbeeinflusst bleibt. Aber auch durch den so mit Eisenhydroxyd vorbehandelten Ex-

trakt konnte ich die Hydrolyse nicht nach 22 Stunden weiter fortschreiten lassen. In den Versuchsproben merkte man auch in 4–5 Stunden mehr oder weniger ausfallendes Eiweiss. So habe ich die Wirkungsdauer auf 4 Stunden abgekürzt, um zu sehen, ob die Inaktivierung schon in relativ kurzer Zeit vollendet sei und ob das PH-Optimum bei solchem Versuch verschieden gefunden werde. Wie aus der Tabelle IX zu ersehen ist, betrug die optimale Azidität auch PH 5.9 und die Hydrolyse 14.5%. So kann man auch nach 4 Stunden die Fermentwirkung als fortbestehend annehmen, wenn man das Resultat nach 22 Stunden in Erwägung zieht. Ich habe ausserdem bestätigt, dass das mit Eisenhydroxydgel vorbehandelte Extrakt auf den Farbgrad des *p*-Nitrophenols keinen Einfluss ausübt, und dass die Synthese des Esters auch durch dieses Ferment nicht vonstatten geht.

Das Experiment mit der Kaninchenleber wurde wie oben erwähnt ausgeführt. Es wird sich nun natürlicherweise die Frage aufdrängen, wie steht es mit anderen Organen? Der Glycerinextrakt von Niere, Magen- und Darmschleimhaut, Milz, Lunge, Muskel und Knochen des Kaninchens wurde untersucht, wobei aber festgestellt wurde, dass keiner der Extrakte auf das *p*-Nitrophenolsulfat auch bei verschiedener Azidität eine Wirkung ausübte. Auch das Vorbehandeln mit Eisenhydroxyd gab dem Glycerinextrakt keinenfalls eine sulfatatische Wirksamkeit. Ich habe ausserdem den zermahlenden Brei solcher Organe auf das Substrat wirken gelassen, aber die Befreiung des *p*-Nitrophenols konnte nicht nachgewiesen werden. Soweit Organextrakte des Kaninchens untersucht wurden, so ist die Sulfatase nur auf die Leber beschränkt.

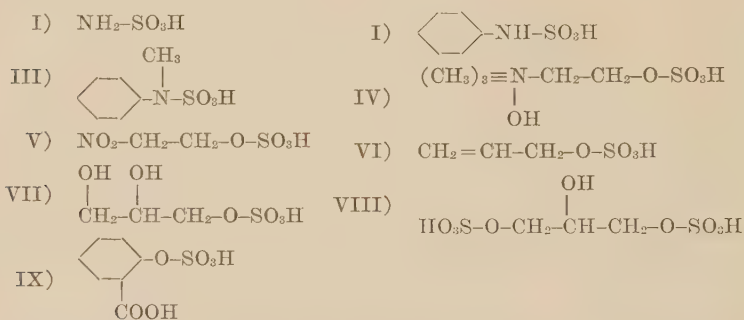
Weiter wurden die Experimente mit den Glycerinextrakten der Leber von anderen Tierarten wie Schwein, Hund und Huhn auf oben beschriebene Weise durchgeführt, wobei die Hydrolyse 10–80% betrug. Die Stärke der Aktivität ergab folgende Reihenfolge: Hund > Huhn > Kaninchen > Schwein.

Ich habe oben die Ergebnisse der Sulfataseforschung mitgeteilt, die mit dem *p*-Nitrophenolsulfat ausgeführt wurde. Durch Verwendung dieses Substrats kann man die Versuche in bequemer

Weise anstellen und die Bestimmungsmethode des Sulfatasewerts in verschiedenen Materialien kann damit leicht ausgearbeitet werden.

Durch die systematische Untersuchung von Neuberg wissen wir nun, dass die aromatischen Schwefelsäureester enzymatisch überhaupt spaltbar sind, aber die aliphatischen Ester nicht, ausgenommen Senfölsulfat und Kohlenhydratsulfat.

Ich habe die sulfatatische Hydrolysierbarkeit an folgenden Verbindungen geprüft:



Bei diesen Substraten war die Zusammensetzung der Versuchslösung wie folgt:

M/100 Substratlösung	10.0 ccm
Puffer	5.0 „
Ferment	2.0 „
Wasser	3.0 „

Nach 24 Stunden wurde die Lösung mit gleichem Volumen 10% Trichloressig enteiweißt. Dem klaren Filtrat wurde 10% Bariumchlorid tropfenweise zugesetzt. Falls eine gewisse Hydrolyse stattfindet, kann man in der Lösung eine Trübung oder einen Niederschlag beobachten. Keine Trübung bedeutet selbstverständlich das Intaktbleiben der Substrate.

Die gebrauchten Fermentlösungen waren Glycerinextrakt von Leber und Magen des Kaninchens, dialysierte 5% Takadiastase und wässriger Extrakt aus Leberpulver des Seeohrs (*Haliotis gigantea*). Das letzte Ferment wurde zuerst von Soda und Koyama (1935) eingehend untersucht und ist sehr aktiv sowohl

auf Phenolsulfat als auch Glucosulfat. Die Angabe wurde von mir bei dem *p*-Nitrophenolsulfat bestätigt (Tabelle X).

Die ersten 3 Substrate (I–III) wurden ins Experiment eingeführt, um zu sehen, ob die N-S-Bindung enzymatisch spaltbar sei, weil die N-P-Bindung, wie von Ichihara(1933) früher beobachtet, durch eine Art Phosphatase, die Phosphamidase, hydrolysierbar ist. Die Versuche mit den Schwefelsäureamidverbindungen fielen negativ aus. Diese Verbindungen waren an sich, im Gegensatz zu den Phosphorsäureamidverbindungen, auch in verschiedener Azidität recht stabil und eine spontane Spaltung konnte nicht beobachtet werden.

Die nächsten 5 Schwefelsäureester waren auch enzymatisch nicht spaltbar. Einführung der basischen Gruppe, Nitrogruppe, Doppelbindung oder Oxygruppe hebt also die Resistenz der aliphatischen Schwefelsäureester gegen die Sulfatase nicht auf. Das negative Resultat bei dem Glycerosulfat war angesichts der Spaltbarkeit des Zuckersulfats auffallend. Soda(1934) hat die Nichtspaltbarkeit des Mannitsulfats angegeben.

Das letzte Substrat, *o*-Carboxyphenolsulfat, war enzymatisch hydrolysierbar. Dieser Ester war ausserdem in verschiedener Azidität beständig. Manaka(1932) und Arai(1934) haben früher den spontanen Zerfall des *o*-Carboxyphenolphosphats untersucht. Die Labilität dieser Verbindung hängt in interessanter Weise von dem  $P_H$  der Lösung ab und die maximale spontane Spaltung ist bei  $P_H$  5.6 zu beobachten, wo das an der Carboxylgruppe dissoziierte aber an der zweiten Dissoziationsstufe des Phosphorsäurerests nicht ionisierte Molekül maximal vorhanden ist. Dass der veresterte Schwefelsäurerest einbasisch und in verschiedener Azidität total dissoziiert ist, hat mit der Beständigkeit des *o*-Carboxyphenolsulfats zu tun.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Als Puffer wurden *M*/2 Essigsäure-Acetat, *M*/10 Phosphat, und *M*/10 Glykokoll-Natron verwendet. Das  $P_H$  wurde an der Versuchslösung elektrisch oder mit Indikatorpapier gemessen. Die Versuchstemperatur war während des ganzen Experimentes 37°.

## I. Die Substrate.

Die Schwefelbestimmung an den Substraten wurde nach Säurehydrolyse wie üblich als Bariumsulfat gravimetrisch ausgeführt.

a) *p*-Nitrophenolschwefelsäure wurde nach Czapek (1914) durch Verestern des *p*-Nitrophenols (Merek) in Pyridin durch Chlorsulfonsäure hergestellt und das Kaliumsalz aus wenigem Wasser umkristallisiert.

<i>Analyse:</i>	$C_6H_4NO_6SK$ (257.2)
Berechnet	S 12.5%
Gefunden	S 12.5%

b) *Phenylsulfaminsäure* konnte in gleicher Weise aus Anilin und Chlorsulfonsäure synthetisiert werden. Das Kaliumsalz wurde aus 60% Alkohol umkristallisiert.

<i>Analyse:</i>	$C_6H_5NSO_3K$ (211.2)
Berechnet	S 15.2%
Gefunden	S 15.6%

c) *Cholinschwefelsäureester* wurde nach Schmidt (1905) aus konzentrierter Schwefelsäure und Cholinhydrochlorid hergestellt und aus wenigem Wasser umkristallisiert.

<i>Analyse:</i>	$C_3H_{12}NO_4S$ (183.2)
Berechnet	S 17.5%
Gefunden	S 18.2%

d) *Amidosulfonsäure* wurde nach Raschig (1892) bereitet, indem man durch Hydroxylaminhydrochlorid Schwefeldioxyd leitete und den entstandenen Kristall aus 50% Alkohol umkristallisierte.

<i>Analyse:</i>	$NH_2SO_3H$ (97.1)
Berechnet	S 33.0%
Gefunden	S 33.9%

e) *Methylphenylsulfaminsäure* wurde nach Traube (1891) aus Monomethylanilin und Chlorsulfonsäure aufgebaut und das Kaliumsalz aus 95% Alkohol umkristallisiert.

<i>Analyse:</i>	$C_7H_7NSO_3K$ (225.2)
Berechnet	S 14.6%
Gefunden	S 14.2%

f) *o*-Carboxyphenylschwefelsäure wurde als Kaliumsalz nach



Meldola (1878) früher von Tamura in unserem Institut bereitet und aufbewahrt.

<i>Analyse:</i>	$C_7H_5O_6SK_2$ (294.3)
Berechnet	S 10.9%
Gefunden	S 10.6%

g) *Nitroäthylschwefelsäure* wurde derart hergestellt, dass man zuerst nach Demuth und Meyer (1888)  $AgNO_2$  auf ätherische Lösung des Glykoljodhydrins einwirken liess und den so erhaltenen Nitroäthylalkohol in gleicher Weise wie bei *p*-Nitrophenolsulfat in das Kaliumsalz des gesuchten Esters führte. Das mit absolutem Alkohol extrahierte Salz wurde mit Äther gefällt.

<i>Analyse:</i>	$C_2H_4NSO_6K$ (209.2)
Berechnet	S 15.4%
Gefunden	S 14.9%

h) *Allylschwefelsäure* wurde als Bariumsalz nach Szyman-ski (1885) bereitet.

<i>Analyse:</i>	$(C_3H_5O_4S)_2Ba$ (411.6)
Berechnet	S 15.6%
Gefunden	S 15.4%

i) *Glyceromonoschwefelsäure*.

Herstellung des Calciumsalzes nach Pelouze (1836) gelang mir nicht. Das Salz konnte aber in folgender Weise bereitet werden. 23 g Glycerin bidestillat (Kahlbaum) versetzt man tropfenweise unter Eiskühlung mit 25 g konz. Schwefelsäure. Die Temperatur soll nicht über  $15^\circ$  steigen. Das Gemisch wird nun auf dem siedenden Wasserbad eine Stunde erhitzt, wieder abgekühlt, mit 100 g Eis gemischt und mit Calciumcarbonat gegen Kongo neutralisiert. Das von Calciumsulfat und überschüssigem Carbonat befreite Filtrat wird nun bei  $35^\circ$  unter vermindertem Druck zum Syrup eingeeengt. Diesen versetzt man mit 200 ccm absolutem Alkohol in Portionen unter starkem Schütteln. Unlösliche Masse klebt an der Wand des Kolbens. Die alkoholische Lösung wird filtriert, mit gleichem Volumen absoluten Alkohols verdünnt. Das gesuchte Calciumsalz kann daraus durch gleiches Volumen Äther als nadlige Kristalle ausgefällt werden. Die in dem Kolben zurückbleibende Masse wird weiter mit 95% Alkohol



extrahiert und das Calciumsalz kann in gleicher Weise daraus erhalten werden. Ausbeute 13 g.

<i>Analyse:</i>	$\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{S})_2(382.3)$
Berechnet	S 16.8%
Gefunden	S 16.1%

j) *Glycero-di-schwefelsäure.*

23 g Glycerin und 49 g konz. Schwefelsäure werden gemischt. Die Reaktion geht unter Wärmeentwicklung vor sich. Nach einer Stunde löst man das Gemisch mit 70 ccm Wasser und neutralisiert gegen Lackmus unter Eiskühlung mit Kaliumcarbonat. Die Lösung wird mit gleichem Volumen Alkohol versetzt, im Wasserbad erhitzt und heiss filtriert. Aus dem Filtrat scheidet sich das Kaliumsalz in Nadeln aus.

<i>Analyse:</i>	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_6\text{S}_2\text{K}_2(328.3)$
Berechnet	S 19.5% ..
Gefunden	S 19.5%

## II. Die Fermente.

a) *Taka-ferment:* 5% Takadiastaselösung wurde 24 Stunden in einem Kollodiumsack dialysiert.

b) Rohrzuckerextrakt der Kaninchenleber wurde derart hergestellt, dass der fein zermahlenen Leber 10 faches Volumen 5% Rohrzuckerlösung zugesetzt und nach 24 stündigem Stehen im Eisschrank zentrifugiert wurde.

c) Der Glycerinextrakt der Kaninchen- und Seeohr (*Haliotis gigantea*)-leber: der Leberbrei wurde mit 2 fachem Volumen Glycerin gut vermischt und nach 24 stündigem Stehen im Eisschrank zentrifugiert. Diese Fermentlösung der Kaninchenleber büsst auch bei Aufbewahrung im Eisschrank allmählich ihre Wirksamkeit ein und ist in ca. 40 Tagen unwirksam.

d) Der mit rotem Eisenhydroxydgel behandelte Glycerinextrakt wurde derart hergestellt, dass man zuerst das dem Glycerinextrakt gleiche Volumen Eisenhydroxydgel ( $0.04 \text{ g Fe}(\text{OH})_3$  in 1 ccm) abzentrifugiert und dem so gewonnenen Bodensatz den ebenbesprochenen Glycerinextrakt hinzusetzt, nach einstündigem gutem Schütteln wieder zentrifugiert und den Abguss als Ferment

benutzt.

e) Die Fermentlösung der Seeohr (*Haliotis gigantea*)-leber wurde nach Soda und Koyama (1935) durch wässrige Extraktion des getrockneten Leberpulvers hergestellt und gegen Wasser dialysiert. Bei meiner Versuchsanordnung war die Lösung zu stark wirksam, daher wurde sie beim Gebrauch mit Wasser 10 fach verdünnt.

### III. Resultate.

#### 1) Versuche mit der Takadiastase.

Die Versuchslösung:

M/1000 <i>p</i> -Nitrophenolsulfat	10.0 ccm
Pufferlösung	5.0 „
Fermentlösung	1.0 „
Wasser	4.0 „

TABELLE I.

	pH	4.0	4.6	5.0	5.6	5.9	6.9	8.0	8.9	10.0
24 Stdn.	%	38.6	89.5	92.0	93.0	89.3	64.1	39.7	21.6	2.5
48 Stdn.	%	55.4	94.9	97.2	97.5	93.0	84.9	56.7	29.7	3.0

TABELLE II.

	pH	5.0	5.2	5.4	5.6	5.8
24 Stdn.	%	92.0	96.0	94.2	93.0	89.2

#### 2) Versuche mit der Kaninchenleber.

##### a) Die Spaltung durch Zuckerextrakt.

M/1000 <i>p</i> -Nitrophenolsulfat	10.0 ccm
Puffer	5.0 „
Ferment	3.0 „
Wasser	2.0 „

TABELLE III.

	pH	4.0	5.0	5.9	6.9	8.0
24 Stdn.	%	1.1	1.2	11.3	10.0	1.8
48 Stdn.	%	1.2	1.3	11.6	10.8	2.2

## b) Die Spaltung durch Zuckerextrakt.

<i>M</i> /100 <i>p</i> -Nitrophenolsulfat	1.0 cem
Puffer	5.0 „
Ferment	10.0 „
Wasser	4.0 „

TABELLE IV.

	pH	5.0	5.6	5.9	6.6	6.9	7.7	8.0
24 Stdn.	%	2.3	4.7	16.1	14.0	13.1	4.9	4.6
47 Stdn.	%	3.1	5.8	16.7	14.6	14.2	5.8	5.1

## c) Wirkung des Glycerinextrakts.

<i>M</i> /1000 <i>p</i> -Nitrophenolsulfat	10.0 cem
Puffer	5.0 „
Ferment	3.0 „
Wasser	2.0 „

TABELLE V.

	pH	4.0	5.0	5.9	6.9	8.0
23 Stdn.	%	5.9	12.7	21.1	21.2	14.4
46 Stdn.	%	6.7	14.5	21.3	22.0	15.6

d) Wirkung des beim vorherigen Experiment gebrauchten, aber eine Woche lang im Eisschrank aufbewahrten Glycerinextraktes.

<i>M</i> /100 <i>p</i> -Nitrophenolsulfat	1.0 cem
Puffer	5.0 „
Ferment	10.0 „
Wasser	4.0 „

TABELLE VI.

	pH	6.0	5.6	5.9	6.6	6.9	7.7	8.0
24 Stdn.	%	2.3	4.7	16.1	14.0	13.1	4.9	4.6
47 Stdn.	%	3.1	5.8	16.7	14.6	14.2	5.8	5.1

e) Vergleich der Hydrolyse durch Zusammenwirken des Glycerinleberextrakts und der Takalösung mit derselben durch alleiniges Wirken jedes Ferments.

Dialysierte 5% Takafermentlösung wurde absichtlich 10 fach verdünnt.

	A	B	C
<i>M</i> /1000 <i>p</i> -Nitrophenolsulfat	10.0 cem	10.0 cem	10.0 cem
Puffer	5.0 „	5.0 „	5.0 „
Takaferment (0.5%)	1.0 „	1.0 „	0 „
Leberglycerinextrakt	3.0 „	0 „	3.0 „
Wasser	1.0 „	4.0 „	2.0 „

TABELLE VII.

pH 6.9		A	B	C
24 Std.	%	22.3	9.3	12.8
48 Std.	%	27.1	15.2	13.7
71 Std.	%	32.5	18.6	13.8

f) Versuche über den Einfluss des Glycerins auf die Wirkung des Takaferments.

A	<i>M</i> /1000 <i>p</i> -Nitrophenolsulfat	10.0 cem
	Puffer	6.0 „
	Glycerin	3.0 „
	Ferment	1.0 „
B	<i>M</i> /1000 Substratlösung*	10.0 cem
	Puffer	6.0 „
	Wasser	3.0 „
	Ferment	1.0 „

TABELLE VIII.

pH 5.0	nach 24 Std.	nach 48 Std.
A	91.8%	97.5%
B	92.2%	97.1%

g) Spaltung durch den mit Eisenhydroxyd behandelten Glycerinextrakt.

Die Versuchsanordnung:

<i>M</i> /1000 <i>p</i> -Nitrophenolsulfat	10.0 cem
Puffer	5.0 „
Ferment	3.0 „
Wasser	2.0 „

TABELLE IX.

	pH	4.0	4.6	5.0	5.6	5.9	6.6	6.9	7.7	8.0
4 Stdn.	%	5.3	10.1	10.6	11.8	14.5	12.7	12.2	10.8	8.4
22 Stdn.	%	5.8		13.2		43.0		32.1		12.1
46 Stdn.	%	6.7		14.2		45.0		33.8		12.8

## 3) Die Spaltung durch Seeohrleberextrakt.

<i>M</i> /1000 <i>p</i> -Nitrophenolsulfat	10.0 ccm
Pufferlösung	5.0 „
Ferment	a „
Wasser	5-a „

TABELLE X.

PH 6.9

	Ferment	Glycerinextr. d. Leberbreis. 3 ccm	Wasserextr. d. Leberpulvers. 1 ccm (10 fach verdünnt)
24 Stdn.	%	101	99

## LITERATUR.

- Akizuki, H. (1937): J. Biochem., **25**, 43.  
 Arai, J. (1934): J. Biochem., **20**, 465.  
 Czapek, E. (1914): Mh. Chem., **35**, 639.  
 Demuth, R. u. Meyer, V. (1888): Liebigs Ann. Chem., **256**, 28.  
 Ichihara, M. (1933): J. Biochem., **18**, 87.  
 Kraft, F. u. Bourgeois, E. (1892): Ber. Dtsch. Chem. Ges., **25**, 473.  
 Manaka, C. (1932): J. Biochem., **14**, 481.  
 Meldola, R. (1878): Ber. Dtsch. Chem. Ges., **11**, 1914.  
 Neuberg, C. u. Wagner, J. (1925): Biochem. Z., **161**, 492.  
 Neuberg, C. u. Simon, E. (1925): Biochem. Z., **156**, 365.  
 Pelouze, J. (1936): Liebigs Ann. Chem., **19**, 211.  
 Schmidt, E. (1905): Liebigs Ann., **337**, 54.  
 Soda, T. u. Koyama, S. (1935): J. Chem. Soc. Japan, **56**, 11, 1388.  
 Soda, T. (1934): Bull. Chem. Soc. Japan, **9**, 83.  
 Suzuki, Y. (1936): J. Biochem., **23**, 57.  
 Szymanski, F. (1885): Liebigs Ann. Chem., **230**, 44.  
 Traube, W. (1890): Ber. Dtsch. Chem. Ges., **23**, 1654.  
 Traube, W. (1891): Ber. Dtsch. Chem. Ges., **24**, 362.

## ÜBER DIE EXTRAKTIVSTOFFE AUS KRÖTEN- MUSKEL IN DER LAICHZEIT.

VON

HATIRO HAYASHI u. TAKESHI IWASAKI.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 22. Mai 1937)

In der vorigen Mitteilung (1935) hat einer von uns berichtet, dass er die basischen Bestandteile im Muskel des Riesensalamanders im Winterschlaf untersuchte. Dabei hat er gefunden, dass in der Argininfraktion nur das Methylguanidin, nicht aber das Arginin vorkommt, und dass kein Lysin im Extrakte zu finden ist. Das Kreatin, welches nach Thompson (1917), Thomas u. Goerne (1918) und Felix u. Müller (1928) aus Arginin gebildet wird, hat er (1935) dabei reichlich gefunden. Nach ihm soll das Arginin in Kreatin und Methylguanidin übergehen, um einerseits den Kalkstoffwechsel zu regulieren und andererseits den Tonus des Muskels in Ordnung zu erhalten. Die Beziehungen des Methylguanidins zur parathyreopriven Tetanie bzw. zum Kalkstoffwechsel sind im allgemeinen bereits bekannt, worauf Watanabe (1917/18) hingewiesen hat.

Um zu sehen, ob der Muskel der Kröten in der Laichzeit auch solche intermediären Stoffwechselprodukte, wie der Muskel des Riesensalamanders, enthält, haben wir die Extraktivstoffe des Krötenmuskels in der Laichzeit untersucht, wo die Kröten noch ihren Winterschlaf halten. Im Extrakte von 35 kg Muskeln von Kröten wurden ausser *d*-Milchsäure, Tyrosin und Leucin verschiedene Basen gefunden, nicht aber Lysin und Arginin, wie in der folgenden Tabelle angegeben ist.

Aus der Tabelle lässt sich ersehen, dass im Muskel der Kröten kein Arginin aber reichlich Kreatin und Methylguanidin vorkommt, und dass unter den Purinbasen ziemlich viel Xanthin gefunden wurde, wie Scaffidi (1911) und Iwasaki (1935) beobachtet



Basen usw.	Salze (g)	Freie (g)	0/00
Kreatin		42,800	1,220
Kreatinin		0,250	0,007
Xanthin		3,850	0,110
Hypoxanthin	Pikrat 0,540	0,212	0,006
Histidin	Pikrolonat 0,436	0,099	0,003
Methylguanidin	Pikrolonat 1,250	0,288	0,008
Arginin		—	—
Lysin		—	—
Cholin	Platinat 1,100	0,368	0,011
Tyrosin		3,500	0,100
Leucin		35,000	1,000
$\alpha$ -Milchsäure	Zinksalz	34,400	0,989

haben. Dieses zeigt, dass der Nukleinstoffwechsel im Krötenorganismus lebhaft vor sich geht. Im Muskel der Kröten wurde auch eine Menge von Leucin und Tyrosin gefunden, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, was bei der Untersuchung des Muskels vom Riesensalamander nie beobachtet wurde. Nach Sibuya (1931) und Imamura (1922) sollen die Brennmaterien, Fett oder Kohlehydrate aus Aminosäuren bzw. Leucin im Krötenorganismus während des Winterschlafes gebildet werden. Somit scheint eine Menge von Leucin im Muskel der Kröten vorzukommen.

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

35 kg Muskeln von 3000 Kröten wurden sofort nach der Tötung in Äthanol aufbewahrt, durch Pressung von Alkohol befreit und dann unter Zusatz der dreifachen Menge Wasser zwei Stunden lang bei 40° digeriert. Diese Behandlung wurde einige Male wiederholt, um den Stoff im Muskel erschöpfend extrahieren zu können. Der Extrakt wurde mittelst Tannin von Eiweiss befreit. Dann wurde er (ca. 300 Liter) im Vakuum bei 40° zu 5 Liter eingengt, wobei sich eine Menge weisser Krystalle abschied. Die abfiltrierten Kristalle betrugen 35 g. Sie wurden aus heissem Wasser und Alkohol mehrmals umkrystallisiert. Die in Tafeln krystallisierte Aminosäure schmilzt bei 293° und stimmt der

Analyse und allen Eigenschaften nach mit *l*-Leucin überein.

2,385 mg Substanz:	0,219 ccm N (769,2 mm, 15°).		
$C_6H_{13}NO_2$	Ber. 10,69% N	Gef. 10,86% N	
42,3 mg Substanz:	10,8 mg CuO.		
$(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$	Ber. 19,63% Cu	Gef. 19,26% Cu.	

Aus der vom Leucin abfiltrierten Mutterlauge wurden durch Einengen im Vakuum prismatische Krystalle gewonnen, die aus warmem Wasser umkrystallisiert wurden. Die Ausbeute betrug 42,8 g. Sie zeigen beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure Weylsche sowie Jaffesche Reaktion. Der Analyse und allen Eigenschaften nach stimmen sie völlig mit dem Kreatin überein.

2,4 mg Subst.:	0,672 ccm N (762 mm, 27,5°)	
$C_4H_6N_3O_2$	Ber. 32,04% N	
	Gef. 31,87 „ „	

Das von Kreatin abgetrennte Filtrat wurde im Vakuum weiter eingengt, wobei sich eine Menge von Nadelkrystallen abschied, die durch Analyse und durch Prüfung ihrer Eigenschaften als Tyrosin identifiziert wurden. Die Ausbeute betrug 3,5 g.

3,519 mg Subst.:	0,2347 ccm N (770,6 mm, 16,5°)	
$C_6H_{11}O_3N$	Ber. 7,74% N	
	Gef. 7,83 „ „	

Die durch weiteres Einengen syrupartig gewordene Flüssigkeit wurde zuerst als solche mit Äther, dann unter Ansäuerung mit Schwefelsäure je 72 Stunden lang extrahiert. Aus dem letzteren Ätherextrakt wurde *d*-Milchsäure als Zinksalz isoliert. Die Ausbeute betrug 48,7 g.

0,3276 g Subst. verloren bei 110°	0,0426 g $H_2O$ .	
$(C_3H_5O_3)_2Zn \cdot 2H_2O$	Ber. 12,86% $H_2O$	
	Gef. 13,00 „ „	
0,2179 g wasserfreie Subst.:	72,5 mg ZnO	
0,2686 g „ „	„ : 90,3 „ „	
$(C_3H_5O_3)_2Zn$	Ber. 26,85% Zn	
	Gef. 26,73%, 27,00% Zn.	

Die von Fett und *d*-Milchsäure befreite Flüssigkeit wurde nach der Methode von Kossel u. Kutscher(1924) und Shimizu (1921) in 3 Fraktionen, Purinbasen- (1) Hexonbasen- (2) und Aminosäurefraktion (3) geteilt.

1. *Purinbasenfraktion.*

In der Purinbasenfraktion wurde weder Adenin noch Guanin nachgewiesen; dagegen wurde Xanthin (ca. 3,85 g) erhalten, welches prachtvolle Weidelsche und Xanthinreaktion zeigte.

3,014 mg Subst.:	0,960 ccm N (760 mm, 20°)
$C_5H_4N_4O_2$	Ber. 36,83% N
	Gef. 36,81 „ „

Ausser Xanthin wurde daraus Hypoxanthin als Pikrat (ca. 0,540 g) erhalten, welches aus heissem Wasser mehrmals umkrystallisiert und der Analyse unterworfen wurde.

2,679 mg Subst.:	0,010 ccm N (760,5 mm, 21°).
$C_5H_4N_4O.C_6H_5O_7N_3$	Ber. 26,86% N
	Gef. 26,45 „ „

2. *Hexonbasenfraktion.*

Das als Silberverbindungen von Purinbasen befreite Filtrat wurde nach Entfernung des Silbers im Vakuum zum Sirup eingengt, wobei sich 0,25 g Kreatinin als Krystalle abschieden, die deutlich Weylsche sowie Jaffesche Reaktion aufwiesen.

2,535 g Subst.:	0,626 ccm N (762 mm, 27°)
$C_4H_7ON_3$	Ber. 28,27% N
	Gef. 28,16 „ „

Aus dem von Kreatinin abgetrennten Filtrat wurde nach Kossel u. Patten (1903) das Histidin zuerst als Hg-verbindungen, dann als Pikrolonat isoliert, welches in hellgelben büschelförmigen Nadeln krystallisiert und sich bei 225° zersetzt. Die Ausbeute betrug 0,436 g.

2,435 mg Subst.:	0,48 ccm N (762 mm, 27°)
$C_6H_9N_3O_2.(C_{10}H_5O_5N_4)_2$	Ber. 22,54% N
	Gef. 22,48 „ „

In dem entquecksilberten Filtrat wurde kein Carnosin gefunden. Aus diesem Filtrat wurde nach Iwasaki (1935) Methylguanidin als Pikrat isoliert, welches sich bei 201° zersetzt und bei der Mischprobe mit dem aus Riesensalamandern keine Depression zeigt. Um das Methylguanidin völlig zu gewinnen,

wurde das Filtrat nach Entfernung der Pikrinsäure nach Kutscher u. Lohmann (1906) mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung ausgefällt, wobei ein Pikrolonat 1,25 g vom Schmelzpunkt 275–290° gewonnen wurde. Dies zeigt bei der Mischprobe mit dem aus Riesensalamandern keine Schmelzpunktsdepression.

2,245 mg Subst.: 0,558 ccm N (764 mm, 21°)

$C_2H_7N_3 \cdot C_{10}H_5O_5N_4$  Ber. 29,07% N

Gef. 29,04 „ „

Das von Methylguanidin befreite Filtrat wurde durch Silberlösung wieder gefällt und das von der Fällung abfiltrierte Filtrat nach Entsilberung zu Syrup eingeengt und mit Alkohol erschöpfend extrahiert. Aus dieser alkoholischen Lösung wurde zuerst als Hg-Verbindung, dann als Platinchloriddoppelsalz das Cholin isoliert, welches sich bei 225–234° zersetzt. Die Ausbeute betrug 1,1 g.

2,179 mg Subst.: 0,089 ccm N (759 mm, 19°)

$(C_5H_{11}NOCl)_2PtCl_4$  Ber. 4,54% N.

Gef. 4,67 „ „

64,6 mg Subst.: 21,9 mg PtO

$(C_5H_{11}NOCl)_2PtCl_4$  Ber. 31,68% Pt

Gef. 31,39 „ „

Aus dem von Cholin befreiten Filtrat wurde durch Zusatz von alkoholischer Goldchloridlösung eine minimale Menge von Fällung erhalten, die einen dem Salz von Karnitin ähnlichen Schmelzpunkt hat.

Das von Cholin getrennte und von Quecksilber befreite Filtrat hat bei Zusatz von alkoholischer Pikratlösung keine krystallisierte Fällung ergeben. Obwohl hierbei das von Pikrat befreite Filtrat wieder mit Phosphorwolframsäurelösung gefällt und die Behandlung wiederholt wurde, wurde dabei kein krystallisiertes Lysin-pikrat erhalten.

## LITERATUR.

- Felix, K. u. Müller, H. (1928): Z. Physiol. Chem., **174**, 112.  
Hoppe-Seyler u. Thierfelder (1924): Physiol. u. Pathologisch-chem.  
Analyse s. 577.  
Imamura, A. (1922): Mitt. a. Med. Fakul. Tokyo, **28**, 1.  
Iwasaki, T. (1935): Jl. of Bioch., **22**, 233.  
Kossel, A. u. Patten, A. J. (1903): Z. Physiol. Chem., **38**, 39.  
Kutscher, F. u. Lohmann, A. (1906): Z. Physiol. Chem., **49**, 81.  
Shimizu, T. (1921): Bioch. Z., **117**, 252.  
Shibuya, S. (1931): Jl. of Bioch., **14**, 11.  
Thomas, K. u. Goerne (1918): Z. Physiol. Chem., **104**, 73.  
Thompson, W. H. (1917): Jl. of Physiol., **51**, 111 u. 348.  
Watanabe, C. K. (1917): Jl. of Biol. Chem., **33**, 253.  
Watanabe, C. K. (1918): Jl. of Biol. Chem., **34**, 51; **36**, 531.

## ÜBER DIE HIPPURSÄURE IN DER ASCITESFLÜSSIGKEIT.

VON

KATSUYA SODA UND TAKASHI HEIMA.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. N. Kageura,  
Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 29. März 1937)

Die Benzoesäure, die in pflanzlicher Nahrung enthalten ist oder bei Eiweisszersetzung im Darm entsteht, wird im Organismus mit Glykokoll gepaart und als Hippursäure im Harn ausgeschieden. Der Ort der Hippursäurebildung ist verschieden je nach der Art der Versuchstiere. Selbst bei Tieren von gleicher Art, z. B. beim Hund, ist es noch bestritten, ob die Niere das einzige Organ der Hippursäurebildung ist.

Dank den Untersuchungen von Bunge und Schmiedeberg (1877), Bashford und Cramer (1902), Snapper, Grünbaum und Neuberg (1924) wissen wir, dass die Hippursäuresynthese beim Hund in der Niere stattfindet. Nach Bunge und Schmiedeberg ist sogar die Niere das einzige Organ der Hippursäurebildung. Kingsbury und Bell (1915) fanden dagegen Hippursäure im Blut und in der Leber nach Zufuhr von Glykokoll und Benzoesäure beim Hund, dessen beide Nieren vorher exstirpiert worden waren. Lackner, Levinson und Morse (1918), Delprat und Whipple (1921) beobachteten Verzögerung oder Abnahme der Hippursäureausscheidung beim Hund, dessen Leber durch Hydrazinsulfat bzw. Chloroform oder Phosphor geschädigt worden war. Hiermit ist es wahrscheinlich, dass Hippursäure auch neben der Niere noch in anderen Organen synthetisiert wird.

Beim Kaninchen ist es sicher festgestellt, dass Hippursäure nicht nur in der Niere, sondern auch in der Leber synthetisiert wird. Friedmann und Tachau (1911) fanden in ihrem gemeinschaftlichen Durchblutungsversuch, dass Hippursäure in der Kaninchenleber synthetisiert wird.



Auch beim Menschen spielt die Niere eine grosse Rolle ebenso wie beim Hund und Kaninchen. Snapper, Grübaum und Neuberg (1924) zusammen fanden im Durchblutungsversuch der Niere, die aus einem Kranken an beginnender Nierentuberculose extirpiert wurde, dass Hippursäure aus der zugesetzten Benzoesäure entstand. Aber ob die Niere das einzige Organ der Hippursäuresynthese ist, steht noch nicht fest. Kingsbury und Swanson (1921) berichteten einen Fall schwerster Nephritis, der keine Störung der Hippursäuresynthese zeigte. Daher ist es wohl anzunehmen, dass die Niere auch beim Menschen nicht das einzige Organ der Hippursäuresynthese ist.

Wenn Hippursäure wie oben erwähnt nicht nur in der Niere, sondern auch in anderen Organen synthetisiert wird, so darf man annehmen, dass das Blut, wenn auch in geringer Menge, Hippursäure enthält. Aber Hippursäure wird sowohl im menschlichen wie auch im tierischen Blute bisher nicht sicher nachgewiesen, solange die Niere funktionstüchtig ist. Die eingeführte Benzoesäure wird relativ rasch mit Glykokoll gepaart und als Hippursäure im Harn ausgeschieden. Daher scheint beim Tier nach Zufuhr von Benzoessäure der Hippursäurespiegel des Blutes zu steigen, wenn die Leber an der Hippursäuresynthese teilnimmt. Kanzaki (1932) fand aber keine Hippursäure im Blute des Kaninchens, selbst nach Zufuhr von Benzoessäure in grosser Dosis. Aus diesen Untersuchungsergebnissen möchte man annehmen, dass Hippursäure in der Niere entsteht und sehr bald im Harn ausgeschieden wird, ohne in den allgemeinen Kreislauf zu gelangen. Aber es ist uns ganz unverständlich, dass Hippursäure im Blute des Tieres, besonders des Kaninchens, dessen Leber sicherlich die Fähigkeit zur Hippursäuresynthese besitzt, nicht nachweisbar ist. Es ist vielleicht nicht unmöglich, dass Hippursäure im Blut nachgewiesen werden wird, wenn grössere Mengen Blutes zur Untersuchung gebracht werden. Falls das Blut, wenn auch nur wenig, Hippursäure enthält, so darf man annehmen, dass auch Ascitesflüssigkeit Hippursäure enthält. Schon Meissner (1859) berichtete, dass ein Teil der Hippursäure, die aus der aufgenommenen Benzoessäure im menschlichen Körper entsteht, in Sch weiss

übergeht. Aber diese Untersuchung ist nicht einwandfrei. Schottin, Shepard und Hoffmann (1877) fanden keine Hippursäure im Schweiss nach Einführen von Benzoesäure in den menschlichen Organismus.

Wir bemühten uns in dieser Arbeit Hippursäure in der Ascitesflüssigkeit nachzuweisen, welche Kranken von Leberzirrhose und Leberkrebs ohne Nierenaffektionen entnommen wurde. Die Aufnahme von pflanzlicher Nahrung oder von Benzoesäurederivaten, z. B. Coffein. natriobenzoicum, kann selbstverständlich die Hippursäureausscheidung im Harn beeinflussen. Aber da das Ziel unserer Arbeit ist zu entscheiden, ob Hippursäure in der Ascitesflüssigkeit vorhanden ist oder nicht, so nahmen wir keine besondere Rücksicht auf die Nahrung, und verordneten den Kranken Coffein. natriobenzoicum je nach Bedarf. Wir behandelten 60,8 Liter Ascitesflüssigkeit nach Bunge und Schmiedeberg und stellten 33,4 mg Krystall dar. Dieser Krystall schmolz bei 178°C und enthielt 8,15% Stickstoff. Dadurch ist es festgestellt, dass dieser Krystall reine Hippursäure ist.

Ob das Material dieses Krystalls in der Bauchhöhle bzw. Bauchhöhlenwand synthetisiert oder aus dem Blutstrom transportiert wurde, bleibt ganz unentschieden. Wenigstens liegt es sehr nahe, dass diese Hippursäure wahrscheinlich aus der Blut-hippursäure stammt, deren Gehalt so gering ist, dass sie bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

#### SCHLUSS.

Die Ascitesflüssigkeit, die Kranken von Leberzirrhose und Leberkrebs ohne Nierenaffektionen entnommen wurde, enthält Hippursäure. Der Hippursäuregehalt der Flüssigkeit beträgt nach unserer Untersuchung durchschnittlich 0,055 mg%.

#### EXPERIMENTELLER THEIL.

Die Ascitesflüssigkeit wurde Kranken von Leberzirrhose und Leberkrebs ohne Nierenaffektionen entnommen.

Die gesammte Flüssigkeit wurde mit Alkohol enteiweisst und dann nach Bunge und Schmiedeberg behandelt. Es wurde

33,4 mg Krystall gewonnen. Dieser Krystall schmolz bei 178°C und enthielt 8,15% Stickstoff. (Der Schmelzpunkt der Hippersäure beträgt 187°C, und die berechnete N-Menge für Hippursäure 7,82%.) Es wurde also sicher festgestellt, dass dieses Krystall Hippersäure ist.

Kranke	Alter, Geschlecht	Diagnose	Datum der Bauchpunktion	Menge d. Astitesflüssigkeit (Liter)	Eigenschaften	Anwendungs dauer von Coff.natr.benz. (0,6 gr. tägl.)	Bemerkungen
Fall 1	38 ♂	Leberkrebs	15/VI 17/VI	1,67 3,50	1007-1010.	23/III-16/V 10/VI-15/VI	Ernährung schlecht, Harn-eiweiss (-), kein Ödem, Pat. starb am 14/VII.
Fall 2	56 ♂	Leberzirrrose	23/VIII 3/IX 7/IX 11/IX 14/IX	6,40 6,55 6,45 5,60 5,60	G. 1007-1010. Rivalt (-)	24/VII-14/IX	Ernährung etwas schlecht, Harn-eiweiss (-), kein Ödem, allg. Befinden nicht auffallend gestört.
Fall 3	46 ♂	Leberzirrrose	28/VIII 6/IX 8/IX 11/IX 16/IX	6,10 3,94 5,70 5,60 3,70	serös, gelblich, spez. G. 1007-1010.	20/VII-25/IX	

Zusammen 60,81 Liter

#### LITERATUR.

- Bunge u. Schmiedeberg (1877): Arch. f. exper. Path. u. Pharm., **6**, 233.  
 Bashford u. Cramer (1902): Z. f. physiol. Chem., **35**, 324.  
 Delprat u. Whipple (1921): J. of biol. Chem., **49**, 229.  
 Friedmann u. Tachau (1911): Bioch. Z., **35**, 88.  
 Meissner (1859): De Sudoris secretion. Dissertation. Leipzig.  
 Hoffmann (1877): Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm., **7**, 233.  
 Kanzaki (1932): The J. of Biochem., **16**, 1.  
 Kingsbury u. Bell (1915): J. of Biol. Chem., **20**, 73, 32.  
 Kingsbury u. Swanson (1921): Arch. of int. Med., **28**.  
 Lackner, Levinson and Morse (1918): Bioch. J., **12**, 184.  
 Meissner u. Schepard (1877): Zit. n. Arch. f. exper. Path. u. Pharm., **7**, 233.  
 Schottin: Vierordt's Arch. f. physiol. Heilkunde Jahrgang, **11**, 97.  
 Snapper, Grünbaum u. Neuberg (1924): Biochem. Z., **145**, 40.

## BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER MILZFUNKTION.

### I. Mitteilung: Über den Stoffwechsel der stickstoffhaltigen Substanzen in der Milz.

VON

KATSUYA SODA.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. N. Kageura,  
Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 29. März 1937)

Köllicker und Ecker (1847) beobachteten in der Milz normalerweise die blutkörperchenhaltigen Pulpazellen, die sonst in keinem anderen Organe gefunden werden. Daraus geht hervor, dass die Milz das Organ des Blutkörperchenzerfalles ist. Diese Zellen sind aber, selbst bei manchen Krankheiten mit starkem Blutzerfall, wie z. B. beim hämolytischen Ikterus, nicht so vermehrt, als man erwarten sollte. Wenn Blutkörperchen tatsächlich in der Milz zerstört werden, so muss man annehmen, dass das Milzvenenblut weniger Erythrozyten enthält als das Milzarterienblut. Hierüber angestellte Untersuchungen von Locard, Gibson und Gregrescu (1887) führten aber zum gegenteiligen Resultat. Daher stellte man sich vor, dass die Blutzellen durch die Milz nur geschädigt und erst in der Leber endgültig vernichtet werden. Für diese Art Vorverdauung der roten Blutkörperchen in der Milz sprechen die von Goldschmidt und Strisower (1914) und anderen Forschern (Chaier u. Charlet, 1911; Bolt u. Heeres, 1922) berichteten Ergebnisse. Sie fanden, dass die osmotische Resistenz der roten Blutkörperchen im Milzvenenblut gegenüber dem Milzarterienblut deutlich herabgesetzt ist. Dass aber Erythrozyten in der Tat in der Milz zerstört werden, geht daraus hervor, dass das Milzvenenblut mehr Bilirubin enthält als das Milzarterienblut. Hijmans van den Bergh (1914) fand im Milzvenenblut

---

Die vorliegende Arbeit wurde auf der 3 Tagung (1936) der japanischen Gesellschaft für Ernährung in Tokio vorgetragen.

von perniziösen Anämien einen höheren Bilirubingehalt als im Milzarterienblut. Ernst und Szappanyos (1922) zeigten aus ihrem Durchblutungsversuche der Hundemilz, dass das Blut, welches die Milz durchströmte, bilirubinhaltig ist, während im normalen Blut Bilirubin bekanntlich nicht vorhanden ist. Nicht nur Erythrozyten, sondern auch funktionsuntüchtige Leukozyten werden in der Milz abgebaut.

Diese veralteten und in der Milz untergehenden weissen und roten Blutkörperchen gehen wahrscheinlich verschiedenartiger chemischer Zerstörung weiter entgegen. Aber wie die Milz auf die in ihr zerfallenden Blutelemente einwirkt, bzw. was für chemische Vorgänge beim Blutzerfall in der Milz stattfinden, ist nur wenig bekannt. Zur Klärung dieser Frage stellte ich an isolierter Hundemilz Durchblutungsversuche an.

#### METHODIK.

Aus der A. carotis eines grösseren Hundes, der 24 Stunden lang keine Nahrung aufgenommen hatte, wurde eine möglichst grosse Menge Blut entnommen, sofort defibriniert und koliert. Mit ca. 300 ccm defibriniertem Blut wurde die Hundemilz, die vorher mit defibriniertem Blut ausgewaschen wurde, um das in ihr befindliche fibrinhaltige Blut zu entfernen, aus der A. lienalis durchströmt. Die Durchblutungsdauer betrug meist 2,5 Stunden. Die Durchblutung wurde nach Yamakawa und Mizuki ausgeführt. Vor und nach der Durchblutung wurde der Ammoniak- und Harnstoffgehalt des Blutes nach Krüger-Reich, der Kreatin- und Kreatiningehalt nach Folin-Wu, der Amino-N-Gehalt nach der gasometrischen Methode von van Slyke und der Harnsäuregehalt nach Folin-Denis-Wu bestimmt. Beim Kontrollversuche liess man das Blut nicht durch die Milz, sondern nur durch den Durchblutungsapparat fliessen, und der Gehalt des Blutes an Ammoniak, Harnstoff u.s.w. wurde ganz wie bei dem Hauptversuche bestimmt.

#### RESULTATE.

*Ammoniak*:—

Bei den Hauptversuchen wurde die Milz mit defibriniertem Blut durchströmt.

TABELLE I. Hauptversuch.

Nummer	Körpergewicht d. Hundes (Kg.)	Milzgewicht (Gr.)	Menge d. Durch- strömungsbiltes (cem.)	Durchblutungs- dauer (St.)	Ammoniak-N. (mg%)			Harnstoff-N. (mg%)		
					vor	nach	Diff	vor	nach	Diff
1	18	110	300	2,5	0,42	2,10	+1,68	31,29	28,42	-2,87
2	17	65	300	2,5	0,56	2,10	+1,54	7,04	7,56	+0,52
3	15	127	300	2,5	0,42	2,30	+1,88	7,84	5,32	-2,52
4	15	72	200	1,2	0,35	2,40	+2,05	7,79	7,01	-0,78
5	17	115	300	2,5	0,45	2,50	+2,05	8,02	7,77	-0,25
6	16	135	200	2,0	—	—	—	—	—	—
7	16	200	250	2,0	0,56	2,51	+1,95	8,15	7,87	-0,28
Durchschnitt					0,46	2,32	+1,86	11,69	10,66	-1,03



TABELLE II. Hauptversuch.

Nummer	Gesamt kreatinin (mg%)			Kreatinin (mg%)			Amino-N. (mg%)			Harnsäure (mg%)		
	vor	nach	Diff	vor	nach	Diff	vor	nach	Diff	vor	nach	Diff
1	—	—	—	—	—	—	7,12	17,52	+ 10,40	1,61	4,80	+ 3,19
2	5,26	4,94	- 0,32	1,20	0,98	- 0,22	8,19	10,92	+ 2,73	2,25	2,67	+ 0,42
3	5,17	4,34	- 0,83	1,56	1,09	- 0,47	6,57	9,22	+ 2,65	1,65	2,08	+ 0,43
4	3,98	3,87	- 0,11	1,21	1,20	- 0,01	6,88	12,11	+ 5,23	2,18	2,53	+ 0,35
5	3,55	3,24	- 0,31	1,46	1,25	- 0,21	9,25	19,05	+ 9,80	1,72	9,69	+ 7,97
6	4,21	3,62	- 0,59	1,32	1,16	- 0,16	10,21	19,30	+ 9,09	1,65	9,72	+ 8,07
7	4,15	3,61	- 0,54	1,21	0,94	- 0,27	9,14	18,86	+ 9,72	1,75	6,57	+ 4,82
Durchschnitt 4,39		3,94	- 0,45	1,33	1,10	- 0,23	8,19	15,28	+ 7,10	1,83	5,44	+ 3,61

Bei den Kontrollversuchen liess man das Blut nicht durch die Milz, sondern nur durch den Durchblutungsapparat fliessen.

TABELLE III. Kontrollversuch.

Nummer	Menge d. Durchströmungsblutes (cem)	Durchströmungsdauer (St.)	Ammoniak-N. (mg%)			Harnstoff-N. (mg%)			Gesamtkreatinin (mg%)		
			vor	nach	Diff	vor	nach	Diff	vor	nach	Diff
1	300	2,5	0,72	0,89	+ 0,17	6,00	5,72	- 0,28	5,23	5,08	- 0,15
2	300	2,5	0,67	0,63	- 0,04	5,04	5,08	+ 0,04	5,10	4,56	- 0,54
3	300	2,5	0,61	0,78	+ 0,17	5,74	5,72	- 0,02	4,22	4,25	+ 0,03
4	300	2,0	0,47	0,62	+ 0,15	4,58	4,34	- 0,24	5,13	4,88	- 0,25
Durchschnitt			0,62	0,73	+ 0,11	5,34	5,22	- 0,13	4,92	4,69	- 0,23

TABELLE IV. Kontrollversuch.

Nummer	Kreatinin (mg%)			Amino-N. (mg%)			Harnsäure (mg%)		
	vor	nach	Diff	vor	nach	Diff	vor	nach	Diff
1	1,54	1,51	-0,03	5,36	5,50	kein nennenswer- ter Unterschied	1,12	1,10	-0,02
2	1,48	1,44	-0,04	7,17	7,23		2,08	2,11	+0,03
3	1,19	1,21	+0,02	7,08	7,12		1,63	1,70	+0,07
4	1,21	1,17	-0,04	6,84	6,92		1,51	1,63	+0,12
Durchschnitt	1,36	1,33	-0,03	6,61	6,69		1,59	1,64	+0,05

Nach Mozołowski(1929) entsteht Ammoniak beim Bewahren des Blutes bei Zimmertemperatur zum Teil durch Desaminierung der Adenylsäure. Nach Györgie und Röthler(1927) wird Adenylsäure bei der Autolyse verschiedener Organe, nämlich Niere, Leber, Thymus und Muskeln, leicht desaminiert und es entsteht Ammoniak. Bei der Durchblutung der überlebenden Organe des Hungerhundes, wie Lunge, Leber und Extremitäten, fanden Bornstein und Roese(1929), dass der Ammoniakgehalt des durchströmten Blutes sich nicht ändert oder eine Tendenz zum Sinken zeigt. Aber nach Zusatz von Glykokoll zum Durchströmungsblut fanden sie erhebliche Ammoniakbildung beim Lungen- und besonders beim Leberversuch. Beim Durchblutungsversuch des Magens (Ikebe, 1933; Sumida, 1935) und des Darms (Ikeda, 1934), bei denen keine fremde Substanz zum Blut hinzugeführt war, nimmt der Ammoniakgehalt immer zu. Bei Zusatz von Alanin zum Durchströmungsblut steigt der Ammoniakgehalt beträchtlich an. Daraus folgt, dass sowohl Aminosäure wie auch Adenylsäure Muttersubstanzen des Blutammoniaks sind. Doch müssen noch andere Muttersubstanzen vorhanden sein.

Nach meinen Durchblutungsversuchen steigt der Wert des Blutammoniak-N von 0,46 mg% bis auf 2,32 mg% nach der Durchblutung. Bei den Kontrollversuchen bleibt dagegen der Ammoniak-N fast unverändert. Diese Ammoniakzunahme hat wahrscheinlich zum Teil mit dem Adenylsäureabbau in der Milz

einen Zusammenhang. Dass aber Adenylsäure nicht die einzige Muttersubstanz des Blutammoniak-N ist, folgt daraus, dass der Ammoniakgehalt nicht parallel mit der Steigerung des Harnsäuregehaltes, die später erörtert werden soll, zunimmt.

#### *Harnstoff:—*

Über die Zersetzung oder die fermentative Spaltung des Harnstoffes im Organismus ist bisher nur wenig bekannt. Beim Durchblutungsversuch des Magens vermindert sich der Harnstoffgehalt des Blutes fast immer nach der Durchblutung. In neuester Zeit schliesst Sumida (1935) aus seinen sorgfältig ausgeführten Untersuchungen, dass Urease in der Magenwand existiert.

Nach meinen Durchblutungsversuchen nimmt der Harnstoff-N fast immer ab, während er bei den Kontrollversuchen fast unverändert bleibt. Der Gehalt des Blutes an Harnstoff-N, welcher im Vorblut 11,69 mg% beträgt, vermindert sich bis auf 10,66 mg% nach der Durchblutung. Ob Urease tatsächlich in der Milz wie in der Magenwand vorhanden sei, ist noch unentschieden. Hierüber bedarf es weiterer Untersuchungen.

#### *Kreatin und Kreatinin:—*

Kreatin und Kreatinin sind als Stoffwechselprodukte des Eiweisses anzusehen. Kreatininhaltige Nahrung steigert selbstverständlich die Kreatininausscheidung, doch kommt praktisch nur Fleisch in Betracht. Kreatiningehalt anderen Nahrungseiweisses ist so gering, dass er vernachlässigt werden kann. Nach Folin (1905) sind die Werte des Harnkreatinins bei eiweissreicher und bei eiweissarmer Nahrung quantitativ gleich. Dieses von dem Nahrungseiweiss unabhängig ausgeschiedene Kreatinin ist als ein Stoffwechselprodukt des Gewebseiweisses anzusehen. Bei allen Zuständen, welche mit einem erhöhten Zerfall körpereigenen Gewebseiweisses einhergehen, wie im Hunger (Cathcart, 1909), im Fieber (Bürger, 1921; Skutetzky, 1911; Klercker, 1904) und bei Vergiftung (Cathcart u. Tayler, 1910; Lefmann, 1908) ist die Kreatininausscheidung vermehrt. Dabei kommt es meist zum Auftreten von Kreatinurie. Hierbei ist es nicht unwahrscheinlich, dass der Kreatin- und Kreatiningehalt des

Blutes, welches die Milz durchströmt, durch den Blutkörperchenzerfall in der Milz vermehrt werden könne.

Nach meinen Durchblutungsversuchen der Milz sinken aber die Werte derselben im Gegensatz zu der Annahme wenig ab, im Vergleich mit den Kontrollversuchen. Der Kreatiningehalt, welcher im Vorblut 1,33 mg% beträgt, vermindert sich bis auf 1,10 mg% nach der Durchblutung. Auch bei den Kontrollversuchen vermindert sich der Kreatiningehalt von 1,36 mg% bis auf 1,33 mg%. Und der Gesamtkreatiningehalt des Blutes nimmt von 4,39 mg% bis auf 3,94 mg% bei den Durchblutungsversuchen der Milz und von 4,92 mg% bis auf 4,69 mg% bei den Kontrollversuchen ab. Warum die Werte des Kreatin- und Kreatiningehaltes abnehmen, bleibt dahingestellt. Aber der Verminderungsgrad derselben ist so gering, dass er vernachlässigt werden darf.

#### *Harnsäure:—*

Die reichliche Zufuhr von nucleinreicher Nahrung steigert selbstverständlich die Harnsäureausscheidung. Doch bei purinfreier Kost und selbst beim vollkommenen Hunger wird Harnsäure noch ausgeschieden. Als Herkunft dieses endogenen Anteils der Harnsäure werden Leukozyten (Horbaczewski, 1891), Verdauungssaft der Pankreasdrüsen (Hirschstein, 1907; Mares, 1910; Smetanka, 1911; Stendel, 1922; Abl, 1903), Muskelarbeit und Drüsentätigkeit (Burian, 1900) angegeben. Und alle Vorgänge, welche mit einer vermehrten Zellzerstörung oder Mauserungsprozessen der Zellen einhergehen, z. B. der erhöhte Stoffwechsel des Organismus und die künstliche Steigerung der Drüsentätigkeit durch Pilokarpin, vermögen die Harnsäureausscheidung zu steigern. Bei verschiedenen Krankheiten, besonders bei Leukämie und Pneumonie, wird eine beträchtliche Menge Harnsäure im Harn ausgeschieden. Bei Leukämie, besonders nach Röntgenbestrahlung, die zum weitgehenden Leukozytenzerfall führt, findet man eine erhöhte Harnsäureausscheidung. (Jacob, 1894; Richter, 1895; Kühnau, 1895; Schmidt, 1903.) Beim Lösungsstadium der Pneumonie wird Harnsäure durch die Einschmelzung leukozytenreichen Exsudates in der Lunge vermehrt ausgeschieden. (Dunin

u. Nowaczek, 1897.) Diese erhöhte Harnsäureausscheidung wird durch den gesteigerten Leukozytenzerfall hervorgerufen.

Nach meinen Durchblutungsversuchen der Milz steigt der Harnsäuregehalt des Durchströmungsblutes deutlich an. Der Harnsäuregehalt des Blutes, welcher im Vorblut durchschnittlich 1,83 mg% beträgt, steigt bis auf 5,44 mg% nach der Durchblutung. Bei den Kontrollversuchen verändert der Harnsäuregehalt sich nicht. Es liegt sehr nahe, dass die Harnsäuresteigerung in meinen Versuchen aus dem Blutkörperchenzerfall in der Milz stammt.

#### *Aminosäure:—*

Der Aminosäurewert des Blutes steigert sich nach Aufnahme eiweissreicher Nahrung (Folin u. Denis, 1912), doch stammt er nicht ausschliesslich aus der Nahrung. Im Hungerzustand ist noch Aminosäure im Blut nachweisbar. Nach Marino (1923) ist sogar der Aminosäurewert dabei meist gesteigert. Die vermehrte Aminosäure wird wahrscheinlich durch Einschmelzung von dem relativ entbehrlichen Gewebe gebildet, um als Nährstoffe der lebenswichtigen Organe zu dienen. Loeper, Decourt und Lesure (1926) fanden, dass die Milz die Fähigkeit zur Aminosäurebildung besitzt. Nach ihnen enthält Milzvenenblut höheren Aminosäurewert als Milzarterienblut. Neben der Milz werden noch Nebenniere und Placenta als Aminosäurebildungsort angegeben. (Loeper, Decourt u. Lesure, 1926; Rabinovitsch, 1914.)

Bei verschiedenen Krankheiten, besonders bei Leukämie und Pneumonie, wird Aminosäure vermehrt im Blut und Harn aufgefunden. Dieser erhöhte Aminosäurewert ist vielleicht auf den gesteigerten Leukozytenzerfall zu beziehen. (Okada u. Hayashi, 1922.) Becher und Herrmann (1925–1926) zeigten dagegen, dass der hohe Aminosäurewert des Blutes bei der Leukämie durch die vermehrten und aminosäurereichen Leukozyten verursacht wird.

Nach meinen Durchblutungsversuchen der Milz steigt der Amino-N-Wert des durchströmten Blutes immer unbedeutend oder beträchtlich an, während er bei den Kontrollversuchen sich nicht verändert. Der Amino-N-Gehalt, welcher im Vorblut durch-



schnittlich 8,19 mg% beträgt, steigert sich bis auf 15,28 mg% nach der Durchblutung.

Es ist nun beachtenswert, dass die Werte des Amino-N und auch der Harnsäure nur bei Fällen, bei denen grössere Milz zur Anwendung gebracht wird, beträchtlich gesteigert gefunden werden. Wenn kleinere Milz zur Untersuchung gebracht wird, so ist die Zunahme derselben nicht wesentlich, wenn auch der Durchblutungsversuch relativ glatt ausgeführt wird. Das Gleiche gilt nicht für Harnstoff, Ammoniak, Kreatin und Kreatinin.

Ferner interessiert mich das Untersuchungsergebnis, dass zwischen der Zunahme von Harnsäure und Amino-N ein Parallelismus vorhanden ist. Wenn der Amino-N-Gehalt des Blutes nur wenig gesteigert gefunden wird, so ist die Zunahme der Harnsäure nicht wesentlich. Bei erhöhtem Harnsäuregehalt tritt ein gesteigerter Amino-N-Wert auf. Dieser Parallelismus zwischen hohem Harnsäure- und Aminosäuregehalt ist schon von Becher und Herrmann (1925) betont worden. Bei verschiedenen Krankheiten, besonders bei Leukämie, Pneumonie und kurz vor dem Tode, findet man einen erhöhten Blutaminosäuregehalt, hierbei auch eine Vermehrung des Aminosäuregehaltes. Das Auftreten des Parallelismus zwischen beiden Substanzen ist noch nicht aufgeklärt. Der Zuwachs des Aminosäuregehaltes lässt sich wahrscheinlich durch dieselben Faktoren erklären, die einen erhöhten Anstieg der Harnsäure bewirken.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Nach der Durchblutung der Milz nimmt der Gehalt des Blutes an Ammoniak-N zu, der Gehalt an Harnstoff-N etwas ab, und der Kreatin- und Kreatiningehalt des Blutes bleibt fast unverändert. Der Harnsäure- und Amino-N-Gehalt des Blutes wird nach der Durchblutung sehr vermehrt aufgefunden, und zwischen der Zunahme von Harnsäure und Amino-N ist ein Parallelismus vorhanden. Wenn der Amino-N-Gehalt des Blutes nur wenig gesteigert gefunden wird, so ist die Zunahme der Harnsäure nicht wesentlich. Bei erhöhtem Harnsäuregehalt tritt ein gesteigerter Amino-N-Wert auf. Es ist nicht unwahrscheinlich,

dass diese Steigerung der Harnsäure und des Amino-N als Ausdruck des Blutkörperchenzerfalls in der Milz anzusehen ist.

## LITERATUR.

- Abl (1903): Arch. f. exper. Path., **74**, 119.  
Bolt u. Heeres (1903): Kl. W. 1795.  
Bornstein u. Roese (1929): Bioch. Z., **212**, 127.  
Bürger (1921): Z. f. exper. M., **12**, 1.  
Burian (1900): H-S. Z., **80**, 241.  
Becher u. Herrmann (1925/26): Münch. med. W., **72**, 2178; **73**, 1312.  
Chalier et Charlet (1911): J. de phys. et path. gen.  
Cathcart (1909): J. of Physiol., **39**, 311.  
Cathcart u. Taylor (1910): J. of Physiol., **41**, 276.  
Dunin u. Nowaczek (1897): Z. f. kl. M., **32**, 1.  
Ecker (1847): Z. f. rat. Med.  
Ernst u. Szappanyos (1922): Kl. W., **413**, 641.  
Folin (1905): Amer. J. of Physiol., **13**, 171.  
Folin u. Denis (1912): J. of biol. Chem., **11**, 87; **12**, 141.  
Goldschmidt u. Strisower (1914): 43 Kongr. d. D. Ges. f. Chir.  
Gregurescu (1887): C. r. Soc. Biol.  
Györgie u. Röthler (1927): Bioch. Z., **187**, 194.  
Hijmans van den Bergh (1914): Berl. Kl. W. No. 24.  
Horbaczewski (1891): Mschr. Chem., **17**, 221.  
Hirschstein (1907): Arch. f. exper. Path., **57**, 229.  
Ikebe (1933): The Journ. of Biochem., **17**, 2.  
Ikeda (1934): The Journ. of Biochem., **20**, 2.  
Jacob (1894): Deutsch. Med. W., **20**, 641.  
Köllicker: Z. f. wiss. Zoolog., **1**.  
Klercker (1904): Z. f. kl. M., **68**, 22.  
Kühnau (1895): Z. f. kl. M., **28**, 534.  
Locard, Gibson: J. of Anat. and Physiol., **20**.  
Lefmann (1908): Z. f. physiol. Chem., **57**, 476.  
Loeper, Decourt u. Lesure (1926): C. r. Soc. Biol., **94**, 272, 333.  
Mares (1910): Pflüger Arch., **134**, 59.  
Marino (1923): Arch. Farmacol. sper., **36**, 56.  
Mozolowski (1929): Bioch. Z., **206**, 151.  
Okada u. Hayashi (1922): J. of Biolo. Chem., **55**, 121.  
Rabinovitsch (1914): C. r. Soc. Biol., **76**, 457.  
Richter (1895): Z. f. kl. M., **27**, 290.  
Sumida (1935): The J. of Biochem., No. 2.  
Skutetzky (1911): D. Arch. f. kl. M., **103**, 423.  
Smetanka (1911): Pflügers Arch., **138**, 207.  
Steudel (1922/23): H-S. Z., **124**, 267; **127**, 291.  
Schmidt (1903): D. Arch. f. kl. M., **77**, 505.



## BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER MILZFUNKTION.

### II. Mitteilung: Über die Harnsäurebildung in der Milz.

VON

KATSUYA SODA.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. N. Kageura,  
Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 29. März 1937)

Horbaczewski (1891) digerierte frische Milzpulpa mit Wasser 8 Stunden lang bei 50°C. Dann wurde das Gemisch mit Bleiessig ausgefällt und filtriert. Das Filtrat wurde mit frischem arteriellem Blut in gleicher Menge versetzt und unter Luftzufuhr wieder bei 40°–50°C belassen. Auf diese Weise fand er, dass sich aus Milzpulpa und dem Blut Harnsäure bildet. Die in ähnlicher Weise angestellten Untersuchungen von Spitzer und Wiener (1899) ergaben, dass bei der Digestion von Milz- und Leberauszügen Harnsäure gebildet wird. Aber diese Untersuchungen, die unter von physiologischen Bedingungen weit entfernten Verhältnissen ausgeführt wurden, erlauben es nicht, diese Harnsäurebildung auf die physiologische Milzfunktion zurückzuführen.

Izar (1911) zeigte, dass bei der Durchblutung der Hundeleber mit der gemischten Flüssigkeit von defibriniertem Hundeblut, defibriniertem Rinderblut und Ringerscher Lösung unter Sättigung mit CO<sub>2</sub>, Harnsäure entsteht. Er zeigte auch, dass bei Zusatz von Harnstoff und Dialursäure zur Durchströmungsflüssigkeit Harnsäure aus diesen Substanzen synthetisiert wird. Wiener (1899) zeigte, dass auch in der Säugetierleber ähnliche Harnsäuresynthese wie beim Vogel stattfindet. Diese Harnsäuresynthese in der überlebenden Säugetierleber liess sich von Oppenheimer und Schittenhelm (1913) nicht konstatieren.

Bei verschiedenen Krankheiten wird Harnsäure vermehrt im Harn ausgeschieden. Noorden, Richter, Kühnau, Dunin und

---

Die vorliegende Arbeit wurde auf der 3 Tagung (1936) der japanischen Gesellschaft für Ernährung in Tokio vorgetragen.

Nowaczek (1893–1897) fanden die Harnsäureausscheidung bei Pneumonie, besonders nach der Krise, wesentlich gesteigert. Diese gesteigerte Harnsäureausscheidung fällt zeitlich mit der Resorption des in der Lunge befindlichen leukozytenreichen Exsudates zusammen. Auch bei Leukämie wird eine grosse Menge Harnsäure und Alloxurbasen im Harn ausgeschieden. Krause (1905) und Kühnau (1895) fanden auffallend hohe Harnsäureausscheidung zur Zeit des Abfalls der Leukozytenzahl. Besondere Bedeutung hat die Steigerung der Harnsäureausscheidung bei Leukämie nach Röntgenbestrahlung. (Königer, 1906; Rosenstern, 1906; Stursberg, 1906; Lossen u. Morawitz, 1905.) Lossen und Morawitz fanden eine Steigerung der Harnsäureausscheidung unmittelbar nach Beginn der Bestrahlung und nach Aussetzen derselben. Diese zweite Harnsäuresteigerung fiel zeitlich mit dem starken Leukozytenabfall zusammen. Hiermit darf man annehmen, dass die vermehrte Harnsäureausscheidung bei Pneumonie und Leukämie auf den gesteigerten Leukozytenzerfall zurückzuführen ist.

Über das Vorkommen von Harnsäurevorstufen im Blut wurde erst von Scherer (1851) berichtet. Er zeigte, dass sich im Blut von Leukämikern Hypoxanthin vorfand. Salomon (1875–1879) fand aber kein Hypoxanthin im frischen Blut, während sie beim Bewahren des Blutes bei 24°C–37°C in ihm gebildet wurde. Es gibt keinen wirklichen Hinweis auf das Vorkommen von Nucleosiden im kreisenden Blute. Robert Bass (1913) stellte fest, dass im Blut und zwar in den roten Blutkörperchen Adenin in Form einer säurespaltbaren Verbindung enthalten ist. Jackson (1924) hat die Anwesenheit der Adennucleotiden im Blut nachgewiesen. Engelhardt (1927) stellte fest, dass im Blut tatsächlich Harnsäurevorstufen, welche unter dem Einfluss von Oxydoreduktase in Harnsäure übergehen können, vorhanden sind und dass nach 6 Stunden langem Verweilen bei 37°C die Menge der Harnsäurevorstufen, die ursprünglich äusserst gering ist, auf das 100 fache anwachsen kann. Ferner zeigte er, dass beim Bewahren des Blutes bei Zimmertemperatur die Stickstoffmenge in der Fraktion der freien Purine oder der Nucleoside wächst, während die Stickstoff-

menge in der Nucleotidfraktion gleichzeitig sinkt.

Neulich stellte ich Durchblutungsversuche, die so physiologisch wie möglich bedingt wurden, an isolierter überlebender Hundemilz an, und gelangte zu folgenden Resultaten. Der Harnsäuregehalt des Blutes, welcher im Vorblut nur 1,83 mg% betrug, stieg bis auf 5,44 mg% nach der Durchblutung. Ebenso wie die Harnsäure stieg der Amino-N-Wert des Blutes von 8,19 mg% bis auf 15,28 mg%. Sehr merkwürdig ist, dass Harnsäurebildung in der Milz, nämlich im Organ des Blutkörperchenzerfalls, stattfindet. Bei Pneumônie und Leukämie, besonders zur Zeit des starken Leukozytenzerfalls nach der Krise oder nach der Röntgenbestrahlung, wird Harnsäure vermehrt im Harn ausgeschieden. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Harnsäurebildung in der Milz aus dem Blutkörperchenzerfall in derselben stammt. Von dieser Annahme ausgehend stellte ich weitere Durchblutungsversuche an.

#### METHODIK.

Die Methode der Milzdurchblutung war ganz gleich derjenigen in der I. Mitteilung. Vor und nach der Durchblutung wurden Harnsäure, Phosphorsäure und Purinkörper des Blutes bestimmt. Die Harnsäure wurde nach Folin-Denis-Wu, die Phosphorsäure nach Bell-Doisy und der Amino-N-Wert nach der gasometrischen Methode von van Slyke bestimmt. Zur getrennten Bestimmung der freien oder gebundenen Purinkörper wurde das Blut nach Thanhauser und Czoniczer (1920) behandelt.

#### RESULTATE.

##### *Purinkörper:—*

Als Muttersubstanz der in meinem Versuch gefundenen Harnsäurevermehrung, die in der I. Mitteilung berichtet wurde, kommt zum ersten Adenylsäure, die sich im Blut und besonders in den roten Blutkörperchen befindet, in Betracht. In meinen Kontrollversuchen stieg der Stickstoffgehalt des Blutserums an freien Purinen von 1,22 mg% bis auf 1,41 mg% und der Stickstoffgehalt an nucleotidisch gebundenen Purinen von 2,48 mg% bis auf 3,27 mg% an. In den Durchblutungsversuchen der Milz ist aber



der Zuwachs von Purin-N noch ausgeprägter. Der Stickstoffgehalt des Blutserums an freien Purinen, welcher im Vorblut 1,55 mg% betrug, stieg bis auf 3,51 mg% und der Stickstoffgehalt an gebundenen Purinen von 3,37 mg% bis auf 8,30 mg% nach der Durchblutung. Also muss diese Harnsäurevermehrung nicht nur aus der vorgebildet im Blut vorhandenen Adenylsäure, sondern auch aus der noch hoch molekulären Nucleotidverbindung stammen.

#### *Phosphorsäure:—*

Wenn Adenylsäure tatsächlich als Quelle der in der Milz gebildeten Harnsäure dient, so muss bei ihrer Umwandlung in Harnsäure Phosphorsäure freigemacht werden. Aus der Untersuchung von Weintraud (1895) ergibt sich, dass bei Verfütterung nucleinhaltiger Substanzen Phosphorsäure ebenso wie Harnsäure vermehrt im Harn ausgeschieden wird. Fleischer und Penzoldt (1880) fanden eine beträchtliche Vermehrung der Phosphorsäureausscheidung bei akuter Leukämie. Diese Steigerung der Phosphorsäureausscheidung stammt wahrscheinlich aus dem starken Leukozytenzerfall.

Nach meinen Durchblutungsversuchen der Milz vermehrte sich der Gehalt des Blutes an anorganischer Phosphorsäure, welcher im Vorblut 2,16 mg% betrug, bis auf 4,71 mg% nach der Durchblutung. Und der Gehalt des Blutes an säurelöslicher Phosphorsäure nahm von 10,43 mg% bis auf 11,51 mg% zu. In den Kontrollversuchen verminderte sich dagegen der Gehalt an anorganischer Phosphorsäure von 2,50 mg% bis auf 2,19 mg%, und der Gehalt an säurelöslicher Phosphorsäure vermehrte sich von 11,99 mg% bis auf 12,15 mg%.

Die richtige Beurteilung erfordert aber besondere Vorsicht. Beim Bewahren des Blutes bei Zimmertemperatur bleibt der Gehalt an anorganischer Phosphorsäure nicht konstant, sondern erfährt eine Veränderung, je nach den Versuchsbedingungen, in der einen, oder anderen Richtung. Aus den Untersuchungen von Engelhardt und Braunstein (1928), Lawaczek (1924), Martland, Robinson und Hansman (1924–1925) geht folgendes hervor. Beim Bewahren des unverdünnten Kaninchenblutes bei 37°C bleibt der

Gehalt an anorganischer Phosphorsäure während der ersten Stunde fast konstant. Auf eine geringe Abnahme in den ersten 1,5 bis 3 Stunden folgt ein unbedeutender Zuwachs. Erst bei längerer Aufbewahrung wird eine erhebliche Vermehrung der anorganischen Phosphorsäure beobachtet. Verdünnt man dagegen das Blut mit hyper- oder hypotonischer Kochsalzlösung oder mit physiologischer Ringerscher Lösung, so kommt eine rasche Zunahme der anorganischen Phosphorsäure zu Tage. Dieser starke, rasche Anstieg der anorganischen Phosphorsäure ist wahrscheinlich durch Schädigung der Blutkörperchen durch osmotischer Vorgänge oder spezifische Ionenwirkung bedingt. Es wurde auch festgestellt, dass in den roten Blutkörperchen eine ständige Abspaltung von anorganischer Phosphorsäure aus organischer Phosphorsäure stattfindet. In den vom Serum abgetrennten Erythrozyten wird ein beträchtlicher Zuwachs von anorganischer Phosphorsäure beobachtet, während im Serum die Phosphorsäure fast konstant bleibt. Es gibt noch eine gewisse Beziehung zwischen Phosphorsäure- und Kohlehydratstoffwechsel. (Rona u. Iwasaki, 1926; Jost, 1927; Engelhardt u. Parschin, 1929.) Fügt man Glukose zum extravasierten Blut, so wird anorganische Phosphorsäure als Folge einsetzender Glykolyse in organische Phosphorsäure fixiert. Lässt man durch die Kaninchenleber glukosehaltige Ringerlösung fließen, so nimmt die Menge freierscheinender anorganischer Phosphorsäure bedeutend ab. Beim Durchblutungsversuche der Kaninchenleber mit glukosefreier Ringerlösung nimmt die Menge anorganischer Phosphorsäure bedeutend zu.

Es wird nämlich anorganische Phosphorsäure im überlebenden Lebergewebe ebenso wie im extravasierten Blut aus organischer Phosphorsäure ständig abgespalten, und bei der Glykolyse wird die freierscheinende anorganische Phosphorsäure in organische Phosphorsäure fixiert, wodurch die Abspaltung von anorganischer Phosphorsäure überdeckt wird.

In meinen sorgfältig ausgeführten Durchblutungsversuchen nimmt der Gehalt des durchströmten Blutes an anorganischer und säurelöslicher Phosphorsäure immer zu. Bei den Kontrollversuchen nimmt dagegen der Gehalt an anorganischer Phosphorsäure etwas

ab, und der Gehalt an säurelöslicher Phosphorsäure bleibt dabei fast unverändert. Dieser Zuwachs an Phosphorsäure, besonders an säurelöslicher Phosphorsäure, mit dem Zuwachs an gebundenem Purinkörper zusammen, weist darauf hin, dass Harnsäure nicht nur aus der vorgebildet im Blut vorhandenen Adenylsäure, sondern auch aus dem noch hoch molekulären Purinkörper stammt.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Lässt man durch die Milz defibriniertes unverdünntes Blut fließen, so nimmt der Harnsäuregehalt des durchströmten Blutes wesentlich zu. Nicht nur freie Purine oder nucleosidisch gebundene Purine, sondern auch nucleotidisch gebundene Purine werden im durchströmten Blut vermehrt aufgefunden. Ebenso wie die freien und gebundenen Purine wird anorganische und säurelösliche Phosphorsäure im durchströmten Blut vermehrt aufgefunden. Es liegt nahe, aus diesen Ergebnissen zu schliessen, dass die Harnsäure nicht nur aus der vorgebildet im Blut vorhandenen Adenylsäure, sondern auch aus den noch hoch molekulären Nucleinen in der Milz entsteht.

Ob die Harnsäurebildung in der Milz sich auf den Blutkörperchenzerfall bezieht, ist noch unentschieden, ist aber nicht unwahrscheinlich, wenn auch die Versuche, aus Milzbrei das oxydoreduzierende Ferment darzustellen, misslungen sind. Der starke Leukozytenzerfall bei Pneumonie und Leukämie hat die vermehrte Harnsäureausscheidung zur Folge. Im Blut, besonders in den roten Blutkörperchen, ist die Harnsäurevorstufe, welche unter der Einwirkung von oxydoreduzierendem Ferment in Harnsäure übergehen kann, enthalten. Beim 6 Stunden langen Bewahren des Blutes bei 37°C wächst die Menge der Harnsäurevorstufe auf das 100 fache an. Beim Bewahren des Blutes bei Zimmertemperatur wird anorganische Phosphorsäure ständig aus organischen Verbindungen abgespalten, und diese Abspaltung von anorganischer Phosphorsäure geschieht hauptsächlich in den Erythrozyten. Hiernach liegt es sehr nahe anzunehmen, dass die Harnsäurebildung in der Milz in meinen Versuchen durch den Blutkörperchenzerfall in der Milz verursacht wird.

In den Hauptversuchen wurde die Milz mit defibrierten Blut durchströmt.

TABELLE I. Hauptversuch.

Nummer	Körpergewicht d. Hundes (kg.)	Milzgewicht (gr.)	Menge d. Durchströmungsblutes (ccm)	Durchblutungs-dauer (St.)	Purin-N. im Blutserum (mg%)			Harnsäure (mg%)		
					freie Purine		Diff.	nukleotidisch gebundene Purine		Diff.
					vor	nach		vor	nach	
8	20	130	300	2,5	—	—	—	—	1,71	4,20
9	16	115	300	2,5	—	—	—	—	1,72	9,53
10	18	112	250	3,0	—	—	—	—	1,75	7,01
11	18	118	250	2,5	—	—	—	—	1,68	5,84
21	23	140	300	2,0	1,43	4,10	+2,67	2,91	1,50	3,30
22	21	130	300	2,0	1,37	2,63	+1,32	3,33	1,62	3,00
23	19	115	250	2,0	1,76	4,03	+2,27	5,00	1,60	3,60
24	18	120	250	2,5	1,76	5,04	+3,28	—	1,72	3,71
25	21	130	250	2,5	1,44	1,67	+0,23	2,23	1,50	2,40
Durchschnitt					1,55	3,51	+1,96	3,37	8,30	+4,93
								1,64	4,73	+3,09

TABELLE II. Hauptversuch.

Nummer	Phosphorsäure im Blute (mg%)					
	anorganische Phosphorsäure			säurelösliche Phosphorsäure		
	vor	nach	Diff.	vor	nach	Diff.
8	1,70	3,92	+ 2,22	5,68	6,76	+ 1,08
9	1,72	3,81	+ 2,09	12,12	13,35	+ 1,23
10	2,60	6,31	+ 3,71	13,90	14,90	+ 1,00
11	2,61	4,78	+ 2,17	10,01	11,03	+ 1,02
Durchschnitt	2,16	4,71	+ 2,55	10,43	11,51	+ 1,08

In den Kontrollversuchen liess man das Blut nicht durch die Milz, sondern nur durch den Durchblutungsapparat fliessen.

TABELLE III. Kontrollversuch.

Nummer	Durchströmungs- dauer (St.)	Purin-N. im Blutserum						Phosphorsäure im Blute						Harnsäure im Blute (mg%)		
		freie Purine (mg%)			nukleotidisch gebundene Purine (mg%)			anorganische Phosphorsäure (mg%)			säurelösliche Phosphorsäure (mg%)					
		vor	nach	Diff.	vor	Nach	Diff.	vor	nach	Diff.	vor	nach	Diff.	vor	nach	Diff.
12	2,5	0,83	1,01	+0,18	2,17	3,02	+0,85	3,34	2,73	-0,61	15,84	16,16	+0,32	1,12	1,10	-0,02
13	2,5	0,91	1,08	+0,17	2,27	3,44	+1,17	2,42	1,70	-0,72	9,90	10,52	+0,62	2,08	2,11	+0,03
14	2,5	—	—	—	—	—	—	2,56	2,83	+0,27	11,83	11,36	-0,47	1,63	1,70	+0,07
15	2,0	1,29	1,67	+0,38	3,15	3,79	+0,64	2,22	2,01	-0,21	10,62	11,01	+0,39	1,51	1,63	+0,12
19	2,5	1,83	1,86	+0,03	2,32	2,82	+0,50	1,95	1,68	-0,27	11,76	11,68	-0,08	1,39	1,27	-0,12
Durch- schnitt		1,22	1,41	+0,19	2,48	3,27	+0,79	2,50	2,19	-0,31	11,99	12,15	+0,16	1,546	1,562	+0,016



## LITERATUR.

- Dunin u. Nowaczek (1897): Z. f. kl. M., **32**, 1.  
Engelhardt u. Braunstein (1928): Bioch. Z., **201**, 408.  
Engelhardt u. Parschin (1929): Bioch. Z., **208**, 221.  
Engelhardt (1927): Bioch. Z., **182**, 121, 130.  
Fleischer u. Penzoldt (1880): Dtsch. Arch. f. kl. M., **26**, 368.  
Horbaczewski (1891): Mschr. Chem., **12**, 221.  
Izar (1911): Z. f. physiol. Chem., **73**, 317.  
Jackson (1924): J. of biol. Chem., **9**, 529.  
Kühnau (1895): Z. f. kl. M., **28**, 534.  
Krause (1905): Fortschr. auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen., **8**, 5, 383.  
Königer (1906): Dtsch. Arch. f. kl. M., **87**, 32.  
Lossen u. Morawitz (1905): Deutsch. Arch. f. kl. M., **83**, 288.  
Lawaczek (1924): Bioch. Z., **145**, 351.  
Martland, Robinson u. Hansmann (1924/25): Bioch. J., **18**, 765, 1152; **19**, 117.  
Noorden (1893): Pathol. d. S. W.  
Oppenheimer u. Schittenhelm (1913): Zit. n. Neubauer-Huppert, Analyse des Harns., **2**, 1003.  
Rona u. Iwasaki (1926/27): Biochem. Z., **174**, 293; **184**, 318.  
Rosenstern (1906): Münch. med. W. Nr., **21**.  
Richter (1895): Z. f. kl. M., **27**, 290.  
Spitzer (1899): Pflüger Arch., **76**, 192.  
Salomon (1878): Z. f. physiol. Chem., **2**, 65.  
Scherer (1851): Verh. d. phys. med. Ges. zu Würzburg.  
Stürsberg (1906): Med. Kl. Nr. 8.  
Wiener (1899): Arch. f. exper. Path., **42**, 373.  
Weintraud (1895): Berl. kl. W. Nr., **19**.

## BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER MILZFUNKTION.

### III. Mitteilung: Über die Aminosäurebildung in der Milz.

VON

KATSUYA SODA.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. N. Kageura,  
Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 29. März 1937)

Van Slyke und Meyer (1912), Györgie und Zunz (1913) fanden bei Hunden eine Zunahme des Amino-N-Gehaltes des Blutes nach Fleischfütterung. Gortschkoff, Grigorieff und Koutoursky (1914) fanden beim Menschen ebenfalls eine Zunahme des Blutamino-N nach Eiweissmahlzeiten. Doch stammt die Aminosäure des Blutes nicht ausschliesslich aus der Nahrung. Im Blut des vollkommenen Hungerzustandes ist noch Aminosäure nachweisbar. Marino (1923) fand sogar einen gesteigerten Amino-N-Gehalt im Blut von hungernden Hunden. Also hat die Aminosäure des Blutes zwei Quellen, den endogenen und den exogenen Ursprung. Als Bildungsorte der Aminosäure im Organismus werden Milz, Nebenniere und im Fall der Schwangerschaft Placenta angegeben. Loeper, Decourt und Lesure (1926) fanden im Milzvenenblut einen höheren Aminosäuregehalt als im Blut der Milzarterie. Nach ihnen bezieht sich die Aminosäurebildung in der Milz auf den Zerfall des Bluteiweisses. Sie fanden ferner einen gesteigerten Aminosäuregehalt im Venenblute der Nebenniere im Vergleich mit dem arteriellen Blut derselben, weshalb auch in diesem Organ Aminosäure gebildet wird. Van Slyke und Meyer (1913) bestimmten die Amino-N-Werte der verschiedenen Organe zeitlich im Laufe des Hungerzustandes. Nach ihren Untersuchungen nimmt der Amino-N-Gehalt der Niere und der Leber mit Ablauf des Hungerzustandes immer mehr zu. Auch

---

Die vorliegende Arbeit wurde auf der 3. Tagung (1936) der japanischen Gesellschaft für Ernährung in Tokio vorgetragen.

der Amino-N-Gehalt der Milz zeigt im ganzen eine Tendenz zum Steigen. Also darf man annehmen, dass Aminosäure beim Hungerzustand in diesen Organen entsteht.

Unter verschiedenen pathologischen Verhältnissen wird der Amino-N-Wert im Blut und Harn verändert aufgefunden. Bei Lebererkrankungen, besonders bei akuter Leberatrophie und akuter Phosphorvergiftung, kann eine wesentliche Erhöhung des Aminosäuregehaltes im Blut und Harn festgestellt werden. (Stadie u. van Slyke, 1920; Neuberg u. Richter, 1904; Erben, 1912.) Diese Steigerung des Aminosäuregehaltes im Blut und Harn dürfte durch Zusammenwirkung einer gesteigerten Aminosäurebildung durch autolytischen Zerfall der erkrankten Leber und einer Störung des Aminosäureabbaus infolge der Lebererkrankung zu erklären sein.

Beim Lösungsstadium der Pneumonie, wobei ein rascher autolytischer Zerfall des pneumonischen Exsudates stattfindet, kann man mässige Hyperaminoacidose feststellen. (Erben, 1912; Labbé, 1913; Wolpe, 1924.) Haas (1922) fand im Serum von Pneumonikern nach Krise eine Vermehrung der Tyrosinfraktion.

Bei Leukämie, und zwar bei der myeloischen Leukämie, kann man eine beträchtliche Vermehrung der Aminosäure im Blut und Harn feststellen. (Okada u. Hayashi, 1922.) Erben fand eine gesteigerte Amino-N-Ausscheidung im Harn von Leukämikern, besonders nach Röntgenbestrahlung. Okada und Hayashi führten diesen erhöhten Aminosäuregehalt des Blutes auf einen gesteigerten Zerfall der Leukozyten zurück. Becher und Herrmann (1926) zeigten dagegen, dass die Steigerung des Amino-N-Gehaltes im Blut von Leukämikern durch den hohen Amino-N-Gehalt der vermehrten Leukozyten verursacht wird.

In der I. Mitteilung zeigte ich, dass der Amino-N-Gehalt des Blutes nach der Durchblutung der Milz wesentlich gesteigert aufgefunden wird. Diese Amino-N-Steigerung in meinen Versuchen rührt wahrscheinlich aus dem Blutkörperchenzerfall in der Milz her. Für das Auftreten der Amino-N-Steigerung in meinen Versuchen können aber andere Möglichkeiten vorhanden sein.

Der Aminosäuregehalt der verschiedenen Organe ist schon

früher untersucht worden. Die höchsten Werte finden sich in Darmschleimhaut, Leber und Milz. Am geringsten ist der Amino-N-Wert des Blutes. Van Slyke und Meyer (1913) fanden in der Milz 70 mg% Amino-N 5 Stunden nach der Mahlzeit und 174 mg% 18 Stunden nach derselben. Lässt man durch die aminosäurereiche Milz aminosäurearmes Blut fließen, so könnte Aminosäure aus der Milz in das Blut diffundiert werden. Aber selbst bei der Durchblutung des Darmes, in dem Aminosäure reichlichst enthalten ist, erfährt das durchströmte Blut keine Zunahme, sondern vielmehr eine geringe Abnahme des Amino-N-Wertes nach der Durchblutung. (Ikeda, 1934). Nach diesem Ergebnis gilt es für wahrscheinlich, dass der Zuwachs an Blutamino-N in meinen Versuchen sich auf den physikalischen Diffusionsvorgang nicht bezieht. Ferner muss man berücksichtigen, dass in allen normalen Organen proteolytische Enzyme enthalten sind. Beim Durchblutungsversuch der Milz könnte ein autolytischer Gewebszerfall der Milz zur Erscheinung kommen. Es bestehen also für das Auftreten der Amino-N-Steigerung in meinen Versuchen zwei Möglichkeiten, entweder dass der Zuwachs an Amino-N auf die vitale Funktion der Milz zurückzuführen ist oder dass er durch den post mortem auftretenden autolytischen Gewebszerfall derselben bedingt ist. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Klärung dieser Frage. Am Ende wurde der Gehalt des Blutes an verschiedenen einzelnen Aminosäuren vor und nach der Durchblutung bestimmt.

#### METHODIK.

Der Durchblutungsversuch wurde ganz ähnlich wie bei der I. Mitteilung ausgeführt. Zur Prüfung meiner Annahme, dass der Zuwachs an Amino-N in meinen Versuchen wahrscheinlich auf die vitale Funktion der Milz zurückzuführen sei, stellte ich den Durchblutungsversuch folgenderweise an. Das einmal durch die Milz geflossene Blut wurde getrennt in einer Flasche gesammelt, und dann wurde der Amino-N-Gehalt des in einer bestimmten Zeit in die Flasche abgegossenen Blutes im zeitlichen Verlauf der Durchblutung messend verfolgt. Wenn die Amino-N-Steigerung auf die

vitale Funktion der Milz zurückzuführen ist, so darf man annehmen, dass die Amino-N-Zunahme während der ersten 30 oder 60 Minuten am höchsten ist und dann eine Tendenz zum Sinken zeigt. Ich bestimmte den Amino-N-Gehalt des Blutes, welches vorher mit Schenkscher Lösung enteiwesst wurde, nach van Slyke vor und nach der Durchblutung. Zur Bestimmung der verschiedenen Aminosäuren wurde das Blut nach Kossel und Kutscher behandelt, und in den einzelnen Fraktionen die N-Menge nach Kjeldahl bestimmt.

#### RESULTATE.

Die Resultate sind in Tabellenform gezeigt.

Bei Fall 1, bei dem die Untersuchung unter dem konstanten Druck von 50 mm Hg ausgeführt wurde, zeigte die Erhöhung des Amino-N während der ersten 50 Minuten nur eine geringe Tendenz zum Sinken. Nach 50 Minuten Durchblutungsdauer trat ein unerwartetes Hindernis ein, und es bedurfte ca. 10 Minuten, um dasselbe zu beseitigen. Bald danach wurde der Versuch unter etwas höherem Druck von 60 mm Hg weiter geführt. Im Anfang der zweiten Durchblutung fand ich einen raschen Anstieg des Amino-N, dem ein steiler Abstieg folgte. Nach dieser Untersuchung ist es sehr wahrscheinlich, dass die Amino-N-Steigerung mit dem Blutdruck oder mit der Länge des Blutverweilens in der Milz zusammenhängt.

Bei Fall 2, bei dem der Versuch unter einem bestimmten Druck von 40 mm Hg ausgeführt wurde, zeigte der Amino-N-Wert des Blutes (mg%), welcher während der ersten 60 Minuten der Durchblutung am höchsten war, einen stetigen nicht steilen Abstieg im Laufe der Durchblutung. Die Menge des in je 30 Minuten aus der Milz fließenden Blutes wurde mit der Zeit immer geringer. Berechnet man den absoluten Zuwachs des Amino-N-Wertes in je 30 Minuten, so ergibt sich, dass die Amino-N-Steigerung in den ersten 30 Minuten sehr viel ausgeprägter ist und dann eine Tendenz zu steilem Sinken zeigt.

Bei Fall 3, bei dem der Versuch ganz ähnlich wie bei Fall 2 ausgeführt wurde, zeigte der Amino-N-Gehalt des Blutes (mg%)



während des ganzen Verlaufes des Versuches eine unregelmässige Schwankung, die im ganzen genommen keine Tendenz zur Ab- oder Zunahme hatte. Die Menge des Blutes, welches in je 30 Minuten die Milz durchströmte, nahm mit der Zeit immer mehr ab. Infolgedessen war die absolute Amino-N-Steigerung in je 30 Minuten am höchsten während der ersten 30 Minuten und zeigte danach eine Tendenz zum Sinken.

Bei Fall 4, bei dem der Versuch unter Regulierung des Druckes so ausgeführt wurde, dass die Menge des in je 30 Minuten durch die Milz fliessenden Blutes fast konstant blieb, ergab es sich auch, dass der Amino-N-Gehalt (mg%) und die absolute Zunahme an Amino-N in je 30 Minuten während der ersten 120 Minuten am höchsten war und danach sehr rasch geringer wurde.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Gemeinsam für diese Untersuchungen ist, dass die Steigerung des Amino-N-Gehaltes (mg%) und des absoluten Amino-N-Wertes des Blutes, welches in je 30 Minuten die Milz durchströmte, während der ersten Durchblutungsperiode am höchsten ist und danach eine Tendenz zum Sinken zeigt. Es liegt nahe aus diesem Ergebnisse zu schliessen, dass die Amino-N-Steigerung des Blutes bei dem Durchblutungsversuch der Milz auf die vitale Funktion der Milz zurückzuführen ist.

Ob die Amino-N-Steigerung des Blutes in meinen Versuchen sich auf den Blutkörperchenzerfall in der Milz bezieht, ist nicht sichergestellt. Versuche, die Beziehung der Amino-N-Steigerung zu dem Blutkörperchenzerfall klarzustellen, wurden vielfach angestellt, ohne zu endogültigen Schlüssen zu gelangen. Aber bei Durchblutungsversuchen der verschiedenen Organe, wie Leber (Bornstein u. Roese, 1929), Magen (Ikebe u. Matsuoka, 1932–1933) und Darm (Ikeda, 1934), wurde eine Amino-N-Steigerung des Blutes bisher nicht aufgefunden. Nur bei Durchblutungsversuchen der Milz, des Organs des Blutkörperchenzerfalls, wird eine Amino-N-Steigerung nachgewiesen. Wie in der I. Mitteilung erwähnt wurde, entsteht nicht nur Amino-N, sondern auch Harnsäure in der Milz. Und es gibt dabei einen Parallelismus



zwischen der Zunahme von Amino-N und Harnsäure. Wenn der Harnsäuregehalt des Blutes sehr gesteigert gefunden wird, so ist die Amino-N-Vermehrung ebenfalls sehr beträchtlich. Diese Harnsäurebildung stammt sehr wahrscheinlich, wie bei der II. Mitteilung gezeigt wurde, aus dem Blutkörperchenzerfall in der Milz. All dieses zusammen führt zur Überzeugung, dass die Amino-N-Steigerung des Blutes in meinen Durchblutungsversuchen wahrscheinlich durch den Blutkörperchenzerfall in der Milz verursacht wird.

Es fragt sich nun, was für Arten von Aminosäuren an der Vermehrung des Amino-N beteiligt sind. Das Blut wurde mit Schenk's Lösung enteiweissst und dann nach Kossel und Kutscher behandelt. Durch Zusatz von Phosphorwolframsäure werden die Diaminosäuren gefällt, während die Monoaminosäuren in der Lösung bleiben. In der mit Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Fraktion, die Monoaminosäuren enthält, steigerte sich der Amino-N-Gehalt, welcher ursprünglich 2,28 mg% betrug, bis auf 6,31 mg% nach der Durchblutung. In der mit Phosphorwolframsäure fällbaren Fraktion, die Diaminosäuren enthält, nahm der Amino-N-Gehalt von 6,21 mg% bis auf 7,71 mg% nach der Durchblutung zu. Der N-Gehalt in der Arginin-, Lysin- und Histidinfraktion wurde nach Kjeldahl bestimmt. Im Vorblut fand ich 0,96 mg% Arginin, 1,67 mg% Lysin und 0,83 mg% Histidin. Diese Werte stiegen bis auf 1,29 mg% Arginin, 2,17 mg% Lysin und 0,99 mg% Histidin im Blut nach der Durchblutung.

Meine Versuchsreihen zeigten also, dass sowohl Monoaminosäuren wie auch Diaminosäuren an der Vermehrung des Amino-N in meinen Durchblutungsversuchen der Milz beteiligt sind.

In den Versuchen wurde der Amino-N-Gehalt des in einer bestimmten Zeit durch die Milz geflossenen Blutes im zeitlichen Verlauf der Durchblutung messend verfolgt.

TABELLE I. (Fall 1.)

Nummer	Vor d. Durchblutung	Nach der Durchblutung (Minute)									
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100
Amino-N-Gehalt d. Blutes (mg%)	4,36	6,61	10,18	7,95	7,89	7,22	6,54	Benötigte Zeit, um das Hindernis zu beseitigen	11,87	13,31	7,04
Menge d. durch die Milz durchströmten Blutes (ccm.)		16,0	23,0	17,5	19,3	21,2	20,0		18,5	24,5	22,0
Absoluter Zuwachs an Amino-N. (mg)		0,36	1,34	0,63	0,68	0,61	0,44		1,39	2,19	0,59
Druck (mm Hg.)		50	"	"	"	"	"		60	"	"

TABELLE II. (Fall 2, 3 und 4.)

Nummer	Druck (mm Hg.)	Vor	Nach der Durchblutung (Minute)					
			0-30	30-60	60-90	90-120	120-150	150-180
2	40							
		4,14	11,60	11,05	9,67	8,01	8,29	
		Menge d. durch die Milz durchströmten Blutes (cem.)	169,0	94,6	107,3	83,0	91,0	
		Absoluter Zuwachs an Amino-N. (mg)	12,61	6,54	5,93	3,21	3,78	
3	45	3,36	8,03	9,51	7,27	8,95	7,83	
		Menge d. durch die Milz durchströmten Blutes (cem.)	132,0	57,0	52,0	45,0	40,0	
		Absoluter Zuwachs an Amino-N. (mg)	6,16	3,51	2,03	2,52	1,79	
		Amino-N-Gehalt d. Blutes (mg%)	11,25	9,06	11,25	10,43	9,06	6,80
4	40-65	Menge d. durch die Milz durchströmten Blutes (cem.)	73,5	76,0	75,0	64,0	45,0	40,0
		Absoluter Zuwachs an Amino-N. (mg)	4,23	2,71	4,31	3,16	1,60	0,52

In den Versuchen wurde die Milz mit defibriertem Blut durchströmt.

TABELLE III.

Nummer	Körpergewicht (kg.)	Milzgewicht (gr.)	Menge d. Durch- strömungsbldtes (ccm.)	Durchblutungs- dauer (St.)	Amino-N. im ent- eiweissten Blut (mg%)			Amino-N. in der Monoaminosäuren- fraktion des Blutes (mg%)			N. in der Diaminosäuren- fraktion des Blutes (mg%)		
					Vor	Nach	Diff.	Vor	Nach	Diff.	Vor	Nach	Diff.
5	17	115	300	2,5	6,42	15,60	+ 9,18	2,24	6,04	+ 3,80	—	—	—
6	16	135	200	2,0									
7	16	200	250	2,0									
8	20	130	300	2,5	6,93	14,06	+ 7,13	2,25	6,03	+ 3,78	10,63	12,18	+ 1,55
9	16	115	300	2,5	6,25	13,50	+ 7,25	2,36	7,01	+ 4,65	3,81	5,32	+ 1,51
10	18	112	250	3,0	5,43	11,08	+ 5,65	2,28	6,14	+ 3,86	4,20	5,63	+ 1,43
Durchschnitt					6,26	13,56	+ 7,30	2,28	6,31	+ 4,02	6,21	7,71	+ 1,50

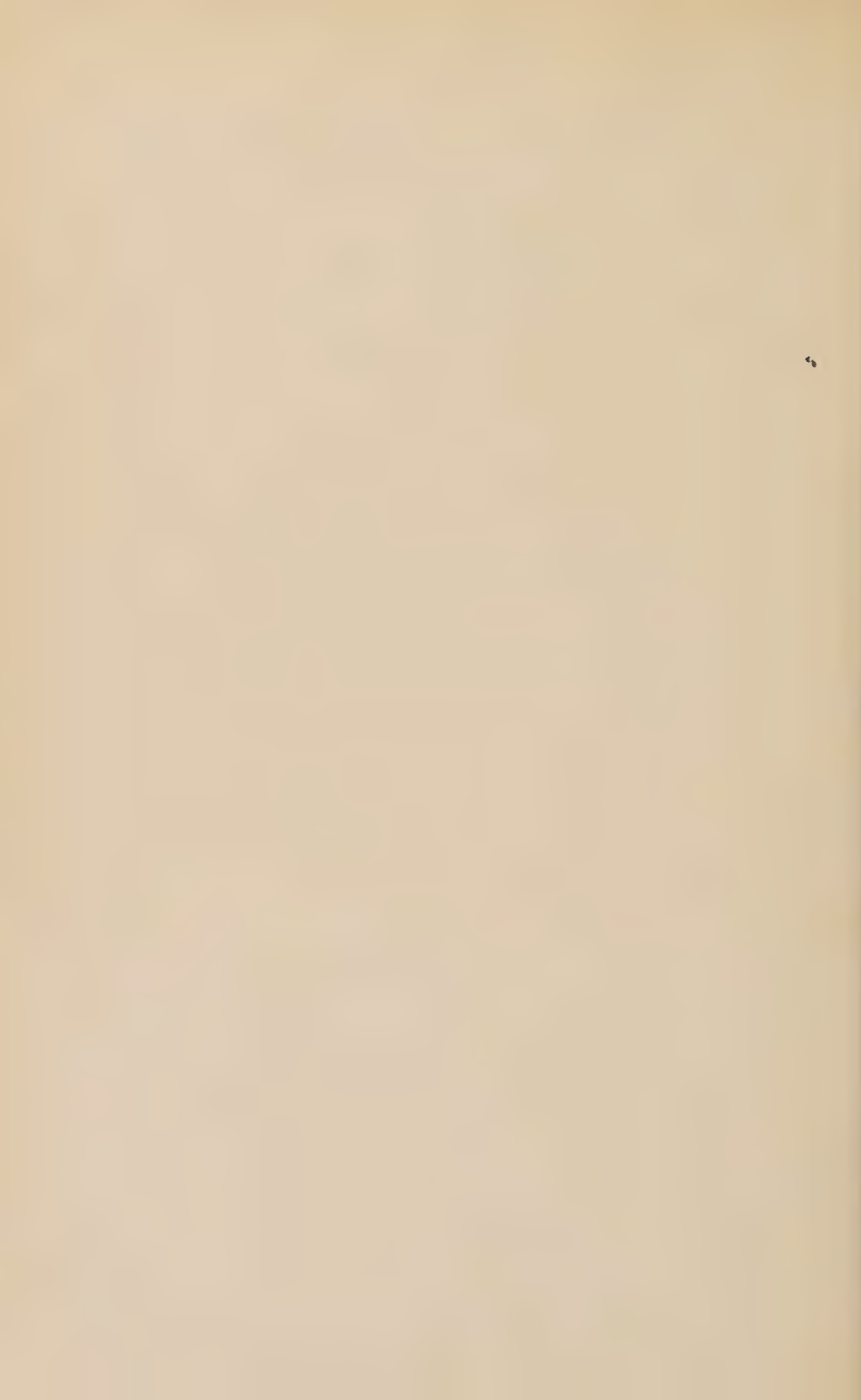
TABELLE IV.

Nummer	Stickstoff in der Diaminosäuren- fraktion (mg%)			Stickstoff in der Argininfraktion (mg%)			Stickstoff in der Lysinfraktion (mg%)			Stickstoff in der Histidinfraktion (mg%)		
	Vor	Nach	Diff.	Vor	Nach	Diff.	Vor	Nach	Diff.	Vor	Nach	Diff.
5, 6, 7	—	—	—	1,14	1,34	+0,20	2,13	2,87	+0,74	0,77	0,67	-0,10
8	10,63	12,18	+1,55	1,12	1,99	+0,87	2,24	2,64	+0,40	1,06	1,20	+0,14
9	3,81	5,32	+1,51	0,74	0,67	-0,07	0,17	0,53	+0,36	0,83	1,29	+0,46
10	4,20	5,63	+1,43	0,83	1,16	+0,33	2,14	2,65	+0,51	0,67	0,80	+0,13
Mittel- wert	6,21	7,71	+1,50	0,96	1,29	+0,33	1,67	2,17	+0,50	0,83	0,99	+0,16

## LITERATUR.

- Becher u. Herrmann (1925/26): Münch. med. W., **72**, 2178; **73**, 1312.  
Bornstein u. Roese (1929): Bioch. Z., **212**, 127.  
Erben (1912): Prag. med. W., **37**, 427.  
Gortschkoff, Grigorieff u. Koutoursky (1914): C. r. Soc. Biol.,  
**76**, 454.  
Györgie u. Zunz (1913): J. of biol. Chem., **21**, 511.  
Haas (1922): Verh. dtsch. Ges. inn. M., **147**.  
Ikebe (1933): J. of Biochem., **17**, 2  
Ikeda (1934): J. of Biochem., **20**, 2.  
Loeper, Decourt u. Lesure (1926): C. r. Soc. Biol., **94**, 272.  
Loeper Decourt, Olivier u. Lesure (1926): C. r. Soc. Biol., **94**, 271,  
333.  
Labbé u. Bith (1913/14): Ref. Kongrzb. f. inn. M., **8**, 621; **9**, 464.  
Marino (1923): Arch. Farmacol. sper., **36**, 56.  
Neuberg u. Richter (1904): Dtsch. med. W., **30**, 499.  
Okada u. Hayashi (1922): J. of biol. Chem., **55**, 121.  
Stadie u. van Slyke (1920): Arch. int. Med., **25**, 693.  
van Slyke (1913/14): J. of biol. Chem., **16**, 125.  
van Slyke u. Meyer (1913/14): J. of biol. Chem., **16**, 231.  
Wolpe (1924): Münch. med. W., **71**, 363.





## ÜBER DAS SCHICKSAL DER DEHYDROCHOLSÄURE IM KANINCHENORGANISMUS.

VON

TOMOYASU FUKUI UND SUKIO ISHIDA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 29. März 1937)

Was das Schicksal der Ketogallensäuren im Tierorganismus betrifft, so wurde zuerst von Shibuya (1933) unter Zufuhr von Dehydrocholsäure eine als Isoreduktodehydrocholsäure genannte 3-Oxy-7,12-diketochoholsäure aus dem Krötenharn isoliert, die nachher von Yamasaki u. Kyogoku (1935) als  $\beta$ -3-Oxy-7,12-diketochoholsäure erwiesen wurde. Weiter wurde von Yamasaki u. Kyogoku (1935) und Kyogoku (1937) unter Zufuhr von Dehydrodesoxychoholsäure  $\alpha$ -3-Oxy-12-ketochoholsäure sowie  $\beta$ -3-Oxy-12-ketochoholsäure aus dem Krötenharn gewonnen. Im Amphibienorganismus wird also die eine Ketogruppe in der Stellung C<sub>3</sub> der Ketogallensäure reduziert.

Um zu sehen, ob die Ketogallensäure auch im Säugetierorganismus solcher Reduktion unterworfen werden kann, haben wir mehreren Kaninchen 12 g Dehydrocholsäure von Fp. 239° intravenös verabreicht und aus dem gesammelten Harn (4,4 Liter) 0,2 g unveränderte Dehydrocholsäure und 13 mg einer reduzierten Oxydiketosäure von Fp. 191–193° erhalten, welche letztere von  $\beta$ -3-Oxy-7,12-diketochoholsäure (Yamasaki, 1935) Fp. 258°, von Reduktodehydrocholsäure (Schenck, 1909; Wieland, 1919; Borsche, 1922) Fp. 186–187° und von 3,7-Dioxy-12-ketochoholsäure (Borsche, 1928; Wieland, 1932; Kawai, 1933) Fp. 219–220° ganz verschieden ist.

Der Mischschmelzpunkt der Oxyketosäure mit der 7-Oxy-3,12-diketochoholsäure von Fp. 195–196° zeigt keine Depression und zwar liegt er bei 192°; die letztere wurde von Fukui (1937) unter der Wirkung von *Bacillus coli communis* aus Dehydrocholsäure

und von Wieland u. Kapitel (1932) aus Cholsäure synthetisch gewonnen. Die aus Kaninchenharn isolierte Oxyketosäure scheint allen Eigenschaften und der Analyse nach höchstwahrscheinlich 7-Oxy-3,12-diketo-cholansäure zu sein, was noch weiter verfolgt werden muss.

Es ist von grossem Interesse, dass im Säugetierorganismus die Ketogruppe in der Stellung C<sub>7</sub> der Ketogallensäure selektiv reduziert wird, genau wie dies bei der Wirkung von *Bacillus coli communis* der Fall war.

Die dem Kaninchenorganismus eingeführte Dehydrocholsäure wird also teils unverändert, teils reduziert als 7-Oxy-3,12-diketo-cholansäure im Harn ausgeschieden.

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Den 13 Kaninchen, welche drei Tage lang keine Nahrung erhalten hatten, wurde zweimal täglich je 1 ccm einer 10%igen Natriumdehydrocholatlösung intravenös injiziert; täglich zweimal, am Morgen und am Abend, wurde der Harn durch Katheterisieren gesammelt. Die Harnmenge betrug 4,4 Liter. Die verabreichte Dehydrocholsäuremenge war insgesamt 12 g. Der Harn wurde im Vakuum bei niedriger Temperatur bis zur Syrupkonsistenz eingeeengt, mit absolutem Alkohol extrahiert und filtriert. Nach der Verdünnung mit einer grossen Menge Wasser wurde das wieder zum halben Volumen eingeeengte alkoholische Filtrat unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure erst fünfmal mit je 400 ccm Petroläther, dann einige Male mit Benzol geschüttelt, um das Fett zu entfernen.

Die saure alkoholische Fraktion wurde unter Neutralisierung mit Soda auf dem Wasserbad abgedampft, um sie vom beigemengten Petroläther, Benzol und Alkohol zu befreien. Nach nochmaliger Ansäuerung wurde sie erschöpfend ausgeäthert. Der Ätherauszug wurde mit 5%iger Sodalösung gut geschüttelt, die Sodafraktion nach dem Abdampfen des Äthers mit verdünnter Salzsäure wieder gefällt. Der dabei ausgeschiedene schmutzige bräunliche Niederschlag (ca. 0,7 g) wurde in verdünnter Alkohollösung mit Tierkohle zweimal entfärbt und die Lösung im Vakuum vom

Alkohol befreit, wobei sich eine krystallinische Substanz abschied. Die Ausbeute betrug ca. 0,2 g. Sie wurde erst aus verdünntem Alkohol, dann aus verd. Essigsäure umkrystallisiert. Die reine Ausbeute betrug 0,126 g. Nadeln vom Schmelzpunkt 237–238°C. Der Krystall zeigt keine Pettenkofersche, Myliusse oder Hammarstense Reaktion. Mit Essigsäureanhydrid und konz. Schwefelsäure färbt er sich nur gelb.

Spez. Drehg.: 52,2 mg Subst. in 10 cem Alkohol, 2 dm,

$\alpha = +0,31$ ,  $[\alpha]_D^{21} = +29,69^\circ$ .

4,962, 4,210 mg Subst.: 13,058, 11,028 mg CO<sub>2</sub>, 3,810, 3,097 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> Ber. C 71,64% H 8,45%

Gef. „ 71,77%, 71,44% „ 8,59%, 8,23%.

Der Krystall zeigt bei der Mischprobe mit reiner Dehydrocholsäure keine Schmelzpunktdepression. Sein Äthylester krystallisiert in feinen Nadeln und schmilzt bei 222°.

Aus der von Dehydrocholsäure abgetrennten alkoholischen Mutterlauge schied sich beim weiteren Einengen im Vakuum noch eine kleine Menge (ca. 13 mg) von kurzen, derben prismatischen Nadeln ab. Der Krystall zeigt keine Pettenkofersche, Myliusse oder Hammarstense Reaktion. Mit Essigsäureanhydrid und konz. Schwefelsäure färbt er sich anfangs orange, dann kirschrot, endlich bräunlich rot. Diese Reaktionslösung zeigt starke Fluorescenz. Der Krystall addiert weder Brom noch Wasserstoff. Schmelzpunkt 191–193°.

3,472 mg Subst.: 9,070 mg CO<sub>2</sub>, 2,770 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub> Ber. C 71,24% H 8,97%

Gef. „ 71,27% „ 8,93%.

Bei der Mischprobe mit 7-Oxy-3,12-diketochoholsäure von Fp. 196° schmilzt der Krystall bei 190–192°. Der Krystall zeigt also mit 7-Oxy-3,12-diketochoholsäure keine Schmelzpunktdepression.

## LITERATUR.

- Borsche, W. u. Hallwass, F. (1922): Ber. Chem. Ges., **55**, 3318.  
Borsche, W. u. Feske, E. (1928): Z. f. physiol. Chem., **176**, 114.  
Fukui, T. (1937): J. of Biochem., **25**, 61.  
Kawai, S. (1933): Z. f. physiol. Chem., **214**, 71.  
Kyogoku, K. (1937): Z. f. physiol. Chem., **246**, 99.  
Schenck, M. (1909): Z. f. physiol. Chem., **63**, 308.  
Shibuya, S. (1933): J. of Biochem., **17**, 159 u. 358.  
Wieland, H. u. Börsch, E. (1919): Z. f. physiol. Chem., **106**, 190.  
Wieland, H. u. Kapitel, W. (1932): Z. f. physiol. Chem., **212**, 269.  
Yamasaki, K. u. Kyogoku, K. (1935): Z. f. physiol. Chem., **233**, 29  
u. **235**, 43.

## THE COLORIMETRIC MICRO-METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF DESOXYCHOLIC AND CHOLIC ACID IN BLOOD.

By

YOSIMI ABE.

*(From the Institute of Medical Chemistry, The Kyusyu Imperial University, Hukuoka, Japan, Director Prof. K. Kodama.)*

(Received for publication, June 7, 1937)

Many quantitative methods of determining bile acid in blood have been published. All of them, however, are based on the Pettenkofer reaction or its modification, so that they only allowed for cholic acid determination, but not for desoxycholic acid, which cannot be assumed as less important in the physiological function than cholic acid. In a previous report, the author published a colorimetric method for its quantitative determination in bile. With a slight modification in the extraction process of cholic acids, the method is proved to be applicable for blood, the details of which are reported here.

### REAGENTS.

- 1) Absolute alcohol.
- 2) Saturated  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  solution in water with 0.4% Ba acetate.  
The bottle should contain some crystalline  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ . This reagent is recommended by Josephson (1935).
- 3) Quartz sand.
- 4) Concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- 5) 15% NaOH.
- 6) Ethyl acetate, dried and neutralised if necessary.
- 7) Concentrated HCl.
- 8) Ether.
- 9)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  I. Pure phosphoric acid (Merk) is diluted with a small amount of water until its specific weight becomes 1.625 at  $22^\circ\text{C}$ . Its concentration is roughly 78% by



weight.

- 10)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  II. Pure phosphoric acid (Merk). The specific weight should be 1.750 at 22°C. The concentration is nearly 89% by weight.
- 11) Vanillin-alcohol solution. 5 gm. of pure vanillin is dissolved in 250 cc. of 96% alcohol.

#### PROCEDURE.

Into three 100 cc. volumetric flasks, each containing 50 cc. absolute alcohol, are introduced 2 cc. of the  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Ba acetate solution, followed by an exactly measured amount (5–10 cc.) of the blood to be analysed, and the flask is thoroughly shaken. The blood must not contain an excess of oxalate or citrate, as they precipitate barium. A few grains of quartz sand are then added, and the flask is placed in a boiling water-bath for about 5 minutes. During the first 1–2 minutes it should be shaken in order to prevent the precipitated protein from sticking to the wall. After cooling, neutral alcohol is added up to nearly 100 cc., and the flask is kept overnight until the supernatant fluid becomes clear.

After the volume is brought exactly to 100 cc. it is filtered. The greater part of barium, remaining in excess in the filtrate, is precipitated by passing  $\text{CO}_2$  gas, and its remaining trace removed with 0.5 cc. of concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . The flask is put aside for a while until the supernatant fluid becomes clear. The precipitate is filtered off, the filtration being repeated until a quite clear filtrate is obtained. The precipitate is washed several times with a small portion of fresh alcohol, and the final filtrate and wash alcohols are brought together. Then the alcohol is gradually evaporated on the boiling water-bath. When the evaporation of alcohol is complete, 5 cc. of 15% NaOH are added to the residue, and warmed on the boiling water-bath until the residue dissolves completely. The resulting solution is decanted into a test tube. The evaporating dish is thoroughly washed two times each with 5 cc. of 15% NaOH on the boiling water-bath to secure complete solution of the bile salts. After the whole NaOH solution is brought together into a test tube, it is heated in a boiling water-bath for 12 hours to ensure

the hydrolysis of the combined bile acid. The hydrolysed solution is poured into the Kumagawa-Sudo extracting apparatus and the lipoid fraction of blood is extracted off with 50 cc. of ethyl acetate on the boiling water-bath for 6 hours. Then the solution is slightly acidified with a few drops of concentrated HCl, and the free bile acids flocculated in the solution, are extracted carefully with 50 cc. of ether in the same apparatus for 6 hours, on the water-bath at a constant temperature of 40°C. The resulting ether extract, if turbid, must be filtered through the asbestos and the asbestos is washed several times with some other portions of fresh ether. The ether extracts are brought together, evaporated gradually on the water-bath and any trace of HCl remaining in the flask must be evaporated completely under diminished pressure, since a trace of HCl hinders the colour reaction. To the residue 0.2 cc. of vanillic-alcohol solution is added and again evaporated. In this case even a trace of water should not remain in the flask. To this completely dried residue, 5 cc. of phosphoric acid I are added, and the resulting solution is warmed at a temperature of 50°C for 10 minutes. Then if cholic acid exists, a pink colour develops. After cooling, its specific extinction of cholic acid ( $E_{\text{I cholic.}}$ ) is determined with the Pulfrich's stufenphotometer, using a  $K_5$  filter.

A similar process is repeated with another portion of blood from the same material, using phosphoric acid II and warming for 8 minutes at a temperature of 70°C. In this way  $E_{\text{II mix.}}$  i.e., the specific extinction of cholic acid plus desoxycholic acid in the solution, is measured.

The details of the procedure and the calculation of free cholic and desoxycholic acid are quite the same as described in the previous report so that they are omitted here.

A few examples of the bile acid content of normal dog blood and of the recovery experiments are given in Table I and II.

According to this method it is confirmed that neither cholic nor desoxycholic acid are contained in normal dog blood in a sufficient amount to allow a quantitative determination. The recovery test has also proved that with 0.5–1.0 mg. about 90% was

TABLE I.  
The recovery of desoxycholic acid.

Amount of normal dog blood in cc.	Desoxycholic acid added in mg	Specific extinction	Desoxycholic acid found in mg	Recovered (%)
10	0		0	
10	0		0	
10	0		0	
10	1.0	0.550	0.924	92
10	1.0	0.583	0.904	90
10	1.0	0.532	0.894	89
10	0.5	0.264	0.443	88
10	0.5	0.276	0.463	92
10	0.5	0.268	0.450	90

TABLE II.  
The recovery of desoxycholic acid and cholic acid when added together.

Amount of normal dog blood in cc.	Cholic acid added in mg.	Desoxycholic acid added in mg.	En mix.	En chol.	Cholic acid found in mg.	En chol.	En desoxychol.	Desoxycholic acid found in mg.	Recovered % of cholic acid	Recovered % of desoxycholic acid
5	0.5	0.5	0.610	0.319	0.449	0.342	0.268	0.450	89	90
5	0.5	0.5	0.623	0.324	0.455	0.347	0.276	0.463	91	92
5	0.5	0.5	0.627	0.323	0.454	0.346	0.281	0.471	90	94

recovered. The loss of 10% may be allowed for the micro-method of determining such a substance of high surface activity.

#### SUMMARY.

A new micro-method for quantitative determination of desoxycholic and cholic acid in blood is reported, based on the colour reaction with vanillin and phosphoric acid.

The author is greatly indebted to Prof. K. Kodama and Prof. H. Akaiwa for their kind suggestions and criticism throughout this research.

#### REFERENCES.

- Abe (1937) *J. Biochem.* (Tokyo, **25**, 181.  
Jesephson (1935): *Biochem. J.*, **29**, 1519.

## ÜBER DIE GALLENSÄURE DER KÄNGURU- (MACROPUS GIGANTEUS) UND LEOPARDENGALLE (FELIS LEOPARDUS).

VON

TOSHIZO KIMURA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 7. Juni 1937)

Um die Beziehung zwischen Nahrungsbestandteilen und Gallensäure festzulegen, ist bereits seit Jahren die Galle verschiedener Tiere von mehreren Autoren untersucht worden, aber bis heute kennt man weder spezifische Gallensäuren für einzelne Tierarten noch die Beziehung der Gallensäurebildung zu den Nahrungsbestandteilen.

Doch ist hier zu bemerken, dass in den meisten Gallen von allerlei verschiedenen Tierarten, wie in Krötengalle (1928) Vogलगalle (1933) Mugilgalle (1937) Kaninchengalle (1930), Cholsäure vorkommt, und zwar entweder mit Chenodesoxycholsäure oder mit Desoxycholsäure. Dies scheint auf zwei Muttersubstanzen bei der Gallensäurebildung hinzuweisen.

Durch die freundliche Übersendung von Känguruh- und Leopardengalle aus dem zoologischen Garten in Kobe habe ich mich in diesem Sinne mit der vorliegenden Untersuchung beschäftigt und gefunden, dass die Känguruhgalle aus Glykocholsäure, Glykochenodesoxycholsäure sowie Glykodesoxycholsäure besteht und dass die Leopardengalle hauptsächlich Taurocholsäure enthält.

Bei dieser Gelegenheit danke ich Herrn Sonobe, Direktor des zoologischen Gartens in Kobe, bestens.

## EXPERIMENTELLER THEIL.

*Känguruhgalle:*

Die Gallenblase des Känguruhs ist dünnwandig, hühnereigross, 8 cm lang, 4 cm breit und enthält etwa 40 ccm Galle von gelbgrüner Farbe.

*1. Cholsäure:*

Diese Galle wurde unter Befreiung von Mucin durch Alkohol mit Kalilauge gut verseift, und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure erschöpfend ausgeäthert. Aus diesem Ätherextrakt wurde die Säure in 5%ige Natriumcarbonatlösung aufgenommen, wonach unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure eine schwach gelblichgrüne Fällung erhalten wurde. Diese wurde nach dem Trocknen mit Petroläther von Fettsäuren befreit und wieder in Äther aufgenommen.

Der aus diesem Ätherextrakt erhaltene und aus Essigester und Alkohol mehrmals umkrystallisierte tetraederförmige Krystall schmilzt bei 197–198°. Rohe Ausbeute 0,13 g. Der Krystall zeigt eine prachtvolle Pettenkofer'sche, Mylius'sche und Hammarsten'sche Reaktion. Bei der Mischprobe mit reiner Cholsäure zeigt er keine Schmelzpunktdepression.

Specif. Drehung: 0,01 g Subst. in 5 ccm Alkohol, 1 dm,

$$\alpha = +0,074 \quad [\alpha]_D^{18} = +37,00^\circ$$

Titration: 0,052 g Subst. brauchten 1,26 ccm N/10 NaOH

Äquivalent für  $C_{24}H_{40}O_5$  Ber. 408 Gef. 413

5,118 mg Subst.: 13,276 mg  $CO_2$ , 4,435 mg  $H_2O$

5,253 „ „ : 13,592 „ 4,646 „

für  $C_{24}H_{40}O_5$  Ber. C 70,53% H 9,87%

„ Gef. „ 70,74 „ „ 9,76 „

„ 70,57 „ „ 9,83 „

Der in üblicher Weise bereitete Äthylester der Säure krystallisiert in Nadeln vom Schmelzp. 160° und zeigt mit reinem Cholsäureäthylester keine Schmelzpunktdepression.

*2. Desoxycholsäure:*

Der von Cholsäure befreite Rückstand wurde in Ammoniak mit 10%iger Bariumchloridlösung gefällt, die Bariumsalzfällung

mit Soda in das Natriumsalz verwandelt und mit Salzsäure zerlegt. Die dabei erhaltene getrocknete Fällung wurde aus Essigester und Alkohol umkrystallisiert. Die in glänzenden Prismen krystallisierte Säure schmilzt bei 185–186°. Rohe Ausbeute 0,08 g. Liebermannsche Reaktion: gelborange. Bei der Mischprobe mit der synthetisch hergestellten Margarincholeinsäure zeigt sie keine Schmelzpunktdepression.

Die Säure wurde mit Eisessig einige Minuten umgekocht, wobei eine in Prismen krystallisierte Säure erhalten wurde. Diese Säure schmilzt bei 144° und zeigt mit der synthetisch bereiteten reinen Essigholeinsäure keine Schmelzpunktdepression.

Der nach dem Verdampfen des Petroläthers verbleibende Rückstand wurde aus Alkohol umkrystallisiert. Ausbeute 10,5 mg. Diese in Blättchen krystallisierte Säure schmilzt bei 56–57°. Sie wurde in Alkohol aufgenommen und mit ca. 0,08 g reiner Desoxycholsäure (Smp. 172°) gekocht. Die aus Alkohol in rosettenförmig gruppierten Prismen krystallisierte Säure schmilzt bei 186°.

### 3. *Chenodesoxycholsäure*:

Der von Choleinsäure getrennte Rückstand wurde in Ammoniak wieder mit Bariumchloridlösung gefällt und die Bariumsalzfällung in verdünntem Alkohol mit Tierkohle entfärbt, wobei sich beim Einengen schöne büschelförmige Nadelkrystalle abschieden. Ausbeute ca. 0,09 g.

Die freie Säure ist wohl aus allen Lösungsmitteln schwer krystallisierbar und die amorphe Säure schmilzt bei 110–112°. Sie zeigt Pettenkoffersche, aber keine Hammarstense und Myliussche Reaktion. Bei Liebermannscher Reaktion färbt sich die Säure anfangs violettrot, dann tief braunrot.

Specif. Drehung: 0,0194 g Subst. in 5 ccm Alkohol, 1 dm,  
 $\alpha = +0,055^\circ$   $[\alpha]_D^{18} = +13,82^\circ$

Die mit Chromsäure oxydierte Dehydrosäure krystallisiert in glänzenden Schuppen vom Schmelzp. 152° und zeigt mit reiner Dehydrochenodesoxycholsäure keine Schmelzpunktdepression.

Der in Alkohol unter Zusatz von konz. Schwefelsäure bereitete Äthylester krystallisiert in Nadeln vom Schmelzp. 133° und zeigt



mit reinem Dehydrochenodesoxycholsäureäthylester keine Schmelzpunkterniedrigung.

4,954 mg Subst.:	13,575 mg CO <sub>2</sub> ,	4,340 mg H <sub>2</sub> O
für C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	Ber. C 74,95%	H 9,68%
	Gef. „ 74,76 „	„ 9,80 „

#### 4. Glykokoll:

Das von den Gallensäuren abfiltrierte Hydrolysat wurde im Vakuum bis zum Trocknen eingengt, mit 95%igem Alkohol heiss digeriert und filtriert. Der wieder zur Trocken in Vakuum eingengte Rückstand wurde mit abs. Alkohol extrahiert. In den alkoholischen Extrakt wurde trocknes Salzsäuregas eingeleitet. Hierbei schied sich eine bräunliche Krystallmasse ab, welche abgesaugt und aus wenig abs. Alkohol mehrmals umkrystallisiert wurde. Man erhält so einen weissen Nadelkrystall vom Schmelzpunkt 142–143°.

Ausbeute 1 mg. Er ist in Alkohol, Wasser sehr leicht löslich und stickstoff-, aber nicht schwefelhaltig. Dies muss also salzsaurer Glykokolläthylester sein.

#### *Leopardengalle.*

Die Gallenblase des Leoparden ist daumenkopfgross, 7,5 cm lang, 2 cm breit und enthält etwa 20 ccm Galle von gelblichbräunlicher Farbe. Die durch Hydrolyse der Galle gewonnene Fällung wurde nach der Entfernung der Fettsäure in Ammoniak mit 10%iger Bariumchloridlösung gefällt, wobei nur eine geringe Menge von Fällung gewonnen wurde. Bei der Liebermannschen Reaktion ergab die von Barium befreite Säure nur eine gelborange Farbe. Der Versuch konnte wegen Mangels an Material nicht weiter durchgeführt werden. Es liegt wahrscheinlich Desoxycholsäure vor.

Das ammoniakalische Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure gefällt. Die gut getrocknete Fällung wurde aus Essigester und aus Alkohol mehrmals umkrystallisiert, wobei sich ein Krystall von Tetraedern ergab. Schmelzp. 198°. Ausbeute 0,7 g.

Die Säure ergibt eine prachtvolle Pettenkofer'sche, Mylius'sche und Hammarstensehe Reaktion. Bei der Mischprobe mit

reiner Cholsäure zeigt sie keine Schmelzpunktdepression.

Specif. Drehung: 0,0987 g Subst. in 10 ccm Alkohol, 2 dm,

$\alpha = +0,737$   $[\alpha]_D^{20} = +37,33^\circ$

Titration: 0,073 g Subst. brauchten 1,77 ccm *N*/10 NaOH

Äquivalent für  $C_{24}H_{40}O_5$  Ber. 408 Gef. 412

5,679 mg Subst.: 14,690 mg  $CO_2$ , 5,005 mg  $H_2O$

für  $C_{24}H_{40}O_5$  Ber. C 70,53% H 9,87%

Gef. „ 70,54 „ „ 9,86 „

Der in üblicher Weise bereitete Äthylester krystallisiert aus Alkohol in Nadeln vom Smp.  $160^\circ$  und zeigt mit reinem Cholsäure-äthylester keine Schmelzpunktdepression.

Aus dem von Cholsäure getrennten Hydrolysat wurde nach Salkowski ein langer prismatischer Krystall erhalten, der in Wasser leicht löslich, in Alkohol unlöslich ist. Er ist schwefel- und stickstoffhaltig und schmilzt bei über  $290^\circ$ . Es liegt zweifellos Taurin vor. Die Leopardengalle enthält also hauptsächlich Taurocholsäure.

Der nach dem Verdampfen des Petroläthers verbleibende Rückstand wurde aus verdünntem Alkohol mehrmals umkrystallisiert. Die aus Alkohol in Blättchen krystallisierte Säure schmilzt bei  $68-69^\circ$ . Ausbeute ca. 0,1 g. Bei der Mischprobe mit reiner Stearinsäure zeigt sie keine Schmelzpunktdepression.

#### LITERATUR.

Miyazi, S. u. Kimura, T. (1937): Noch nicht in Druck.

Okamura, T. (1928): J. of Bioch., **8**, 351.

Okamura, S. (1930): Z. Physiol. Chem., **188**, 16.

Yamasaki, K. (1933): J. of Bioch., **18**, 323.



## BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER CHOLADIENSÄURE.

VON

SHIGEKI MIYAZI.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 7. Juni 1937)

Die Choladiensäure aus 3,7-Dioxycholsäure wurde zuerst von H. Wieland (1924) durch Destillation der Anthropodesoxycholsäure im Vakuum als ein Nadelkrystall vom Schmelzp.  $138^{\circ}$  hergestellt. Wie bereits von Wieland (1924) gezeigt wurde, wird je nach der Lage der durch Abspaltung von Wasser erzeugten Doppelbindung ein isomeres Säuregemisch gebildet, welches den üblichen Trennungsmethoden hartnäckig widersteht.

Die bisher bekannten Choladiensäuren wurden von V. Deulofeu (1932) mit seiner neuen übersichtlich als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\varepsilon$ -Choladiensäure zusammengefasst. Die Einheitlichkeit dieser Choladiensäuren ist aber noch nicht nachgeprüft worden. Die Choladiensäure aus Desoxycholsäure wurde vor kurzem von H. Wieland und seinen Mitarbeitern (1936) in zwei Isomere zerlegt.

Im Verlaufe meiner Forschungen über die photochemischen Eigenschaften der ungesättigten Gallensäuren bemühte ich mich, eine einheitliche Choladiensäure zu gewinnen.

Bei der Choladiensäure aus Chenodesoxycholsäure konnte das Isomerengemisch weder durch fraktionierte Krystallisation noch durch Bromanlagerung sicher voneinander getrennt werden. Nach mehrmaliger Umkrystallisation aus Alkohol steigt der unscharfe Schmelzp. des Gemisches von  $138^{\circ}$  bis zu  $148^{\circ}$ ; seine spezifische Drehung beträgt  $[\alpha]_D^{20} = -43,5^{\circ}$ .

Diese Choladiensäure zeigte keine Schmelzpunktdepression mit der Urso-choladiensäure von Iwasaki (1936).

Der Äthylester der Säure ist aus Alkohol gut krystallisierbar und durch seine Hydrolyse wird eine in Nadeln krystallisierte Säure von scharfem Schmelzp.  $150^{\circ}$  erhalten. Diese aus Ester

regenerierte Säure addiert Brom. Es wird dabei nur eine Art von Tetrabromid krystallinisch gewonnen, welches wieder zu der ursprünglichen Säure vom Schmelzp.  $150^{\circ}$  entbromt werden kann. Diese Säure wird in üblicher Weise zu Cholangsäure hydriert, die sich als Propylester erwiesen hat.

#### VERSUCHE.

##### *Vakuumdestillation der Chenodesoxycholsäure.*

9 g Cheno-desoxycholsäure werden im Schwertkolben unter 3–5 mm Hg im Luftbade bei  $120\text{--}130^{\circ}$  2–2½ Stunden lang erhitzt, um die Substanz vollständig zu trocknen. Dann wurde die Badtemperatur rasch auf  $200^{\circ}$  gesteigert und längere Zeit auf  $200\text{--}250^{\circ}$  gehalten, um das Wasser abzuspalten. Bei  $310^{\circ}$  begann die Destillation der Säure und nach einer Stunde war der Process beendet.

Der Destillationsrückstand wurde mit Chloroform und das Destillat mit Alkohol extrahiert. Der vom Lösungsmittel befreite, krystallisierte Rückstand wog 7,2 g und schmolz unscharf bei  $132\text{--}138^{\circ}$ . Nach mehrmaliger Umkrystallisierung aus Alkohol krystallisierte die Säure in Nadeln vom Schmelzp.  $147\text{--}148^{\circ}$ .

Die Säure ist in den meisten organischen Lösungsmitteln löslich, und zwar in kaltem Alkohol und Eisessig ziemlich schwer, in Chloroform und Äther aber sehr leicht.

Liebermannsche Reaktion: sofort krischrot, dann violett, endlich grün.

Spezifische Drehung: 0,117 g in 10 ccm Chloroform, 2 dm,  
 $\alpha = -1,02$   $[\alpha]_D^{20} = -43,59^{\circ}$   
 5,740 mg Subst.: 16,926 mg  $\text{CO}_2$ , 5,102 mg  $\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_2$  Ber. C 80,83% H 10,12%  
 Gef. „ 80,42 „ „ 9,95 „

##### *Choladiensäure-äthylester.*

1 g Choladiensäure (Fp.  $147\text{--}148^{\circ}$ ) wurde in 50 ccm absolutem Alkohol gelöst, mit 0,5 ccm konz. Schwefelsäure versetzt und zwei Stunden lang auf dem Wasserbade erhitzt. Der sich nach Zusatz von wenig Wasser abgeschiedene Ester krystallisiert in langen

durchsichtigen Tafeln vom Schmelzp. 68–70°. Nach mehrmaliger Umkrystallisierung aus Alkohol schmilzt er scharf bei 75°. Ausbeute 85% des Ausgangsmaterials.

Spezifische Drehung: 0,203 g in 10 ccm Chloroform, 2 dm,

$$\alpha = -2,04 \quad [\alpha]_D^{15,5} = -50,24$$

5,059, 6,069 mg Subst.: 15,046, 18,076 mg CO<sub>2</sub>, 4,753, 5,593 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub> Ber. C 81,18 H 10,49

Gef. „ 81,12, 81,23 „ 10,51, 10,31

### *Hydrolyse des Esters.*

1 g Ester wurde in 50 ccm einer 2%igen alkoholischen Kalilauge gelöst und 2½ Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Die Lösung wurde nach Verdünnung mit Wasser mit verdünnter Salzsäure angesäuert und ausgeäthert. Der vom Äther befreiete Rückstand wurde aus Alkohol abermals umkrystallisiert. Es wurden feine Nadeln vom scharfen Schmelzp. 150° erhalten.

Diese Säure ist in Alkohol und Eisessig schwer, aber in Äther und Chloroform leicht löslich. Sie färbt sich in Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure anfangs kirschrot, endlich grün.

Spezifische Drehung: 0,253 g in 10 ccm Chloroform, 2 dm,

$$\alpha = -2,96: \quad [\alpha]_D^{13} = -58,5^{\circ}$$

5,212 mg Subst.: 15,446 mg CO<sub>2</sub>, 4,495 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub> Ber. C 80,83% H 10,12%

Gef. „ 80,83 „ „ 9,61 „

### *Anlagerung von Brom (Choladiensäure-tetrabromid)*

1,66 g Choladiensäure vom Schmelzp. 150° wurden in 50 ccm Äther gelöst, die Lösung unter Kältemischung innerhalb einer Stunde in Reaktion gebracht. Diese Ätherlösung wurde i. V. auf 1/5 ihres Volumens eingeeengt, dabei schied sich ein krystallinisches Pulver ab (etwa 0,8 g). Schmelzp. 170–172°. Es wurde aus Essigester mehrmals umkrystallisiert. Durchsichtige prismatische Krystalle vom Schmelzp. 186–187° (Zers).

Diese Säure ist in Alkohol, Eisessig, Essigester und Äther in der Kälte schwer, aber nach Erwärmen gut löslich.

4,522, 4,878 mg Subst.: 7,130, 7,690 mg CO<sub>2</sub>, 2,220, 2,390 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>4</sub> (676) Ber. C 42,60% H 5,36%

Gef. „ 43,01, 43,01% „ 5,49, 5,48%



*Entbromierung.*

0,5 g Substanz wurden in 10 ccm Eisessig suspendiert und mit 0,5 g Zinkstaub 2 Stunden lang unter häufigem Umschütteln auf dem Wasserbade erwärmt. Dann wurde das Reaktionsgemisch heiss abgesaugt und die heisse Lösung mit wenig Wasser versetzt. Bei langsamem Erkalten krystallisiert die bromfreie Säure in feinen zu Rosetten vereinigten Nadeln aus. Nach nochmaliger Krystallisation aus Alkohol schmilzt sie bei 150°.

Spezifische Drehung: 0,132 g in 10 cc. Chloroform, 2 dm,  
 $\alpha = -1,62$ :  $[\alpha]_D^{14} = -61,36$

Diese Säure zeigt mit der ursprünglichen Säure keine Schmelzpunktdepression.

*Cholansäure-propylester.*

0,5 g Choladiensäure (Fp. 150°) wurde in 20 ccm Eisessig mit 0,05 g Platinoxid unter Wasserstoff geschüttelt. Hierbei nahm 1 Mol Säure 2 Mole Wasserstoff auf. Das von Platinoxid abfiltrierte Filtrat wurde mit Wasser versetzt. Die hierbei erhaltene Cholansäure wurde nach Windaus (1923) als Propylester nachgewiesen.

Schmelzp. 57–58°

5,762 mg Subst.: 17,055 mg CO<sub>2</sub>, 5,730 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub> Ber. C 80,53% H 11,52%

Gef. „ 80,73 „ „ 11,13 „

## LITERATUR.

Deulofeu, V. (1932): Zs. Physiol. Chem., **210**, 30.

Iwasaki, T. (1936): Zs. Physiol. Chem., **244**, 181.

Wieland, H. u. Reverey, G. (1924): Zs. Physiol. Chem., **140**, 186.

Wieland, H., Kraus, K., Keller, H. und Ottawa, H. (1936): Zs. Physiol. Chem., **241**, 47.

Windaus, A. u. Bohne, A. (1923): Ann. d. Chem., **433**, 285.

## ÜBER DAS VORKOMMEN DER CHOLSÄURE UND GEPAARTER SOWIE UNGEPAARTER CHENODESOXYCHOLSÄURE IN MUGILGALLE.

VON

SHIGEKI MIYAZI u. TOSHIZO KIMURA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 7. Juni 1937)

Seit Jahren sind viele Autoren mit der Untersuchung der verschiedenen Gallen beschäftigt, um das Problem der Gallensäurebildung klarzustellen. In diesem Sinne hat Watanabe (1935) bereits die Galle von Mugil *Cephalus* Linne und Takeuti (1937) die "Iwashi"-Fischgalle untersucht und gefunden, dass die beiden Gallen hauptsächlich aus Taurochenodesoxycholsäure bestehen.

Nun haben wir hier mit einer grossen Menge von Mugilgalle gearbeitet und gefunden, dass diese ausser der Taurochenodesoxycholsäure eine geringe Menge von Taurocholsäure und von freier ungepaarter Chenodesoxycholsäure enthält.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

#### 1. Ungepaarte Chenodesoxycholsäure:

Ungefähr 1 Liter aus 1020 Blasen der von Mucin befreiten Mugilgalle wurde mit Kohlensäure gesättigt und erschöpfend (7–8 mal) ausgeäthert, bis der Äther sich nicht mehr anfärbte. Das aus der Ätherlösung gewonnene Säuregemisch wurde in Sodalösung aufgenommen und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Petroläther durchgeschüttelt, um die Fettsäuren zu befreien, wobei eine Fällung erhalten wird.

Die gut getrocknete Fällung wurde mit wasserfreiem Äther extrahiert. (Dabei wurde eine geringe Quantität einer in Äther unlöslichen Säure erhalten, die aber nicht weiter bearbeitet werden konnte.)

Der nach dem Abdampfen des Äthers zurückgebliebene Rückstand wurde in Ammoniak mit einer Bariumchloridlösung gefällt, diese Fällung in verdünntem Alkohol mit Tierkohle entfärbt und auf dem Wasserbade eingengt, wobei sich schöne Nadelkrystalle abschied. Ausbeute ca. 0,15 g.

Die mit Salzsäure zerlegte Säure ist in den meisten organischen Lösungsmitteln leicht löslich und schmilzt beim Trocknen im Vakuum unter Sinterung bei 112°.

Bei Liebermannscher Reaktion färbt sich die Säure anfangs violettrot, dann tief braunrot.

Specif. Drehung: 0,0338 g Subst. in 10 cem Alkohol, 2 dm,  
 $\alpha = +0,072^\circ$   $[\alpha]_D^{20} = +10,6^\circ$

Die durch Oxydation mit Chromsäure erhaltene Dehydrosäure krystallisiert aus Alkohol in breiten Blättchen und schmilzt bei 152°. Bei der Mischprobe mit reiner Dehydrochenodesoxycholsäure zeigt sie keine Schmelzpunktdepression.

5,135, 5,327 mg Subst.: 13,993, 14,449 mg CO<sub>2</sub>, 4,304, 4,479 mg H<sub>2</sub>O.  
 $C_{24}H_{30}O_4$  Ber. C 74,17% H 9,34%  
 Gef. „ 74,32 „ „ 9,38 „  
 „ 73,98 „ „ 9,42 „

Der mit Alkohol und konz. Schwefelsäure bereitete Äthylester der Säure krystallisiert aus Alkohol in Nadeln vom Schmelzp. 133° und zeigt mit Dehydrochenodesoxycholsäureäthylester keine Schmelzpunktdepression.

## 2. Cholsäure:

Die in Äther unlösliche Fraktion wurde im Autoklaven mit 15% iger Kalilauge gut verseift. Aus dem Hydrolysat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ein Rohsäuregemisch erhalten, welches gut getrocknet und durch Extrahieren mit Petroläther von Fettsäuren befreit wurde. Es wurde in Ammoniak mit einer Bariumchloridlösung gefällt. Dabei wurden ca. 25 g Bariumsalzfällung gewonnen. (Chenodesoxycholsäurefraktion). Das ammoniakalische Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure gefällt. Nach wiederholtem Umlösen und Fällern ergab sich ca. 0,2 g Säure, die aus Essigester umkrystallisiert wurde. Die in Nadeln krys-

tallisierte Säure wurde abermals aus Alkohol umkrystallisiert. Die tetraederförmigen Krystalle schmelzen bei 197–198°. Sie zeigen Pettenkofersehe, Myliussehe und Hammarstensche Reaktion. Bei der Mischprobe mit reiner Cholsäure zeigen sie keine Schmelzpunktdepression.

Specif. Drehung: 0,0528 g Subst. in 10 cem Alkohol, 2 dm,

$$\alpha = +0,39^{\circ} \quad [\alpha]_D^{25} = +36,93^{\circ}$$

5,169, 5,246 mg Subst.: 13,969, 13,555 mg CO<sub>2</sub>, 4,591, 4,603 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>5</sub> Ber. C 70,53% H 9,87%

Gef. „ 70,54 „ „ 9,87 „

„ 70,47 „ „ 9,75 „

Der in üblicher Weise bereitete Äthylester krystallisiert aus Alkohol in Nadeln vom Schmelzp. 160° und zeigt mit reinem Cholsäureäthylester keine Schmelzpunktdepression.

Aus der verseiften von Gallensäuren getrennten Mutterlauge wurde nach der Methode von Salkowski ein in Prismen krystallisiertes Taurin gewonnen.

#### LITERATUR.

Takeuti, N. (1937): Arb. Med. Fak. Okayama, **5**, 319.

Watanabe, K. (1935): J. of Bioch., **22**, 119.





ANNOTATIONES  
**ZOOLOGICAE JAPONENSES**

PUBLISHED BY

THE TOKYO ZOOLOGICAL SOCIETY,

COLLEGE OF SCIENCE, IMPERIAL UNIVERSITY OF TOKYO.

Subscription Price: \$6.00 per volume.

**Journal of the Chemical  
Society of Japan**

(Japanese)

Annual Subscription: \$4.00

**Bulletin of the Chemical  
Society of Japan**

(English, French or German)

Annual Subscription: \$2.00

PUBLISHED BY

THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN

c/o Faculty of Science, Tokyo Imperial University.

**ACTA PHYTOCHIMICA**

PUBLISHED BY

THE IWATA INSTITUTE OF PLANT BIOCHEMISTRY.

Subscription Price: \$5.00 per volume.

(Remittance should be sent to Maruzen & Co. Ltd.,

14 Tori Sancho, Nihonbashi, Tokyo)

外字生化學雜誌第二十六卷第二號

昭和十二年九月八日印刷 (定價每一卷)  
昭和十二年九月三十日發行 (内地金拾円)

東京市牛込區市谷加賀町一丁目十一番地  
編輯兼  
發行所

柿内三郎

東京市神田區美土代町十六番地

印刷者 島連太郎

東京市神田區美土代町十六番地

印刷所 三秀舎



# CONTENTS

	Page
KOTAKE, Y. (jr.) und N. ITÔ. Studien über den intermediären Stoffwechsel des Tryptophans .....	161
SHÔJI, Tadashi. Studies on the changes in the physiological condition of the new born infant. V. On the synthesis of indican ....	167
SHIMADA, Toshio. Beiträge zur Kenntnis der Gallensäuren von Fischgalle. Maguro-Fisch ( <i>Thynnus thynnus</i> ) und Ishinagi-Fisch ( <i>Stereolepis ishinagi</i> ) .....	181
ITOH, Ryoji and NAKAMURA, Takeo. Studies on Lipase. IV. Effects of reduction and oxidation on the reversible action of pancreatic lipase and pro-lipase .....	187
IMAIZUMI, Mitzimasa. Über den Abbau der <i>d</i> -Glukosaminsäure durch Mikroorganismen und im Tierorganismus .....	197
YASUDA, Morio. Lipids analysis of the human brain .....	203
KIYOHARA, Kan-iti und IZAWA, Shozô. Über die Einflüsse des Schwangerenharns, des Extraktes der Plazenta, des Prolans, des Serums des schwangeren Kaninchens und der Emulsion der Hypophyse auf Oxydasereaktion des Ovariums, des Uterus und einiger anderer Organe .....	211
MASAMUNE, Hajime and NAGAZUMI, Yoshio. Colorimetric analysis of aminosugars in protein hydrolysates on the pinetiole of Elson and Morgan .....	223
OZAKI, Genei. On the so-called mucosinsulfuric acid (P. A. Levene) from gastric mucosa .....	233
OZAKI, Genei. Glycoproteins from gastric mucosa .....	239
SAITO, Koichiro and SHUEH, Chin Kai. On the influence of urethane anaesthesia upon the gaseous content of the blood. (Blood gas studies performed with a new micro blood gas apparatus. III) .....	247
MORIMOTO, Kazuyoshi. Über die Phenolsulfatase .....	259
HAYASHI, Hatiro u. IWASAKI, Takeshi. Über die Extraktivstoffe aus Krötenmuskel in der Laichzeit .....	275
SODA, Katsuya and HEIMA, Takashi. Über die Hippursäure in der Ascitesflüssigkeit .....	281
SODA, Katsuya. Beiträge zum Studium der Milzfunktion.	
I. Über den Stoffwechsel der stickstoffhaltigen Substanzen in der Milz. ....	285
II. Über die Harnsäurebildung in der Milz .....	297
III. Über die Aminosäurebildung in der Milz .....	307
FUKUI, Tomoyasu und ISHIDA, Sukio. Über das Schicksal der Dehydrocholsäure im Kaninchenorganismus .....	319
ABE, Yosimi. The colorimetric micromethod of quantitative determination of desoxycholic and cholic acid in blood .....	323
KIMURA, Toshizo. Über die Gallensäure der Känguru- ( <i>Macropus giganteus</i> ) und Leopardengalle ( <i>Felis Leopardus</i> ) .....	327
MIYAZI, Shigeki. Beiträge zur Kenntnis der Choladiensäure ....	333
MIYAZI, Shigeki u. KIMURA, Toshizo. Über das Vorkommen der Cholsäure und gepaarter sowie ungepaarter Chenodesoxycholsäure in Mugilgalle .....	337